



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Serotipificación y detección genética de *Salmonella* spp. de origen aviar

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Freshia Rosio HUARCAYA RAMIREZ

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huarcaya F. Serotipificación y detección genética de *Salmonella* spp. de origen aviar. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2020.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0002-6584-439X
DNI o pasaporte del autor	73373984
Código ORCID del asesor	0000-0003-4955-2378
DNI o pasaporte del asesor	10321145
Grupo de investigación	Microbiología Aplicada a la Salud Pública-Animal y de Impacto Ambiental (MASPAIA)
Agencia financiadora	Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (UNMSM)
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima Perú (-12.080729, -76.987032)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

*A mis padres **Rosio y Teófilo**, que con mucho
cariño me enseñan a seguir caminando por
la vida, impulsándome día a día a
superarme en la carrera que en común
compartimos pasión por ella.
¡Lo logramos!*

*A mis hermanos, **Kryscia, Vanessa, Aron, Ximena y
Daniela** quienes me brindan todo su apoyo y
son mi motivo para seguir mejorando como
persona y profesional.*

*A **Álvaro**, mi compañero de vida, gracias por ser y
estar, por tu amor y comprensión.*



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIA
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 30/10/2020

HORA INICIO: 15:00 horas

HORA TÉRMINO: 16:05 horas

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **MV. Mg. Siever Miguel Morales Cauti**

MIEMBRO: **MV. Mg. Gina Castro Sanguinetti**

MIEMBRO: **MV. Mg. Jimny Yoel Núñez Delgado**

ASESOR: **Blg. Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **HUARCAYA RAMIREZ, FRESHIA ROSIO**

CÓDIGO: **12080051**

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 03089-R-18**

TÍTULO DE LA TESIS: **“SEROTIPIFICACIÓN Y DETECCIÓN GENÉTICA DE *Salmonella Spp.* DE ORIGEN AVIAR”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

https://drive.google.com/file/d/11TfWM8O_VcXQnpHofFPi6Qlbc-QKCG0r/view

ID: ntn-hvvj-udk

Grabación archivada en:


https://drive.google.com/file/d/11TfWM8O_VcXQnpHofFPi6QlbcQKCG0r/view

5. NOTA OBTENIDA: (17), (diecisiete)

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
André Sedano Sánchez	44931004	andresedanos@gmail.com
Luis Guillermo Álvarez Vega	71419745	alvarezvega.luisguillermo@gmail.com
Jhonatan David Huamani Pérez	45485253	j.d.huamani.p@gmail.com
Alvaro Vasquez Ydrogo	46924961	alvasquezydrogo@gmail.com
Sofia Gonzales Magallanes	75200383	sofia.gonzales1@unmsm.edu.pe
Faride Altamirano Zevallos	43695598	faltamiranoz@unmsm.edu.pe
Luis Hoyos Sifuentes	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
Miryam Quevedo Urday	40064320	mquevedou@unmsm.edu.pe
Elizabeth Quispe Garay	45009153	elizabeth.quispe11@unmsm.edu.pe
Emelin Cruz Calixto	76287759	emelinvet5@gmail.com

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

Firma	
MV. Mg. Morales Cauti Siever Miguel	
Apellidos y Nombres	
PRESIDENTE	

 <p>Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 13.04.2021 16:04:19 -05:00</p>		
Blg. Mg. Calle Espinoza Sonia Yenny	MV. Mg. Castro Sanguinetti Gina	MV. Mg. Núñez Delgado Jimny Yoel
Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres
ASESORA DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Calle, mi asesora de tesis, quien confió en mí y brindó consejos durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A André Sedano, Jhonatan y Arturo quienes dieron base a el proyecto, compartieron conocimiento y tiempo que fueron parte fundamental para la realización de la tesis.

A el equipo del Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UNMSM: Luis, Sofi y Juan por el apoyo incondicional y por su gran amistad.

Al Instituto Nacional de Salud y a la Sra. Ana Meza del INS, por el apoyo brindado en la serotipificación de los aislados en estudio, así como sus enseñanzas y amistad.

A mi querida Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, por la extraordinaria formación profesional ¡Adelante San Marcos glorioso!

A mis grandes amigos Lesly, Jessenia, Víctor, Winnie, Grecia y demás compañeros, por los gratos momentos y horas de estudio.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA).....	13
2.1.1. SALMONELOSIS HUMANA.....	14
2.1.1.1. PRESENTACIONES CLÍNICAS	16
2.1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	16
2.1.1.3. PAPEL DE LOS ALIMENTOS DE ORIGEN AVIAR Y SUS DERIVADOS	18
2.2. SALMONELOSIS AVIAR	21
2.2.1. PRESENTACIONES CLÍNICAS	21
2.2.1.1. Pullorosis	21
2.2.1.2. Tifosis aviar.....	23
2.2.1.3. Paratifosis.....	24
2.2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PARATIFOSIS AVIAR	26
2.3. GÉNERO <i>Salmonella</i>	27
2.3.1. ANTECEDENTES	27
2.3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	27
2.3.3. TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA.....	28
2.3.4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.....	29
2.3.4.1. Antígenos somáticos (O)	30
2.3.4.2. Antígenos flagelares (H)	30
2.3.4.3. Antígeno capsular (Vi)	30
2.3.5. PATOGÉNESIS	31
2.3.6. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA.....	32
2.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EN LABORATORIO.....	33
2.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	34
2.4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	36

2.4.2.1.	PCR	36
2.4.2.2.	GEN <i>invA</i>	38
2.4.3.	SEROTIPIFICACIÓN.....	38
2.4.3.1.	ESQUEMA DE KAUFFMAN WHITE	39
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1.	DISEÑO DEL ESTUDIO	41
3.2.	LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN	41
3.3.	DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA.....	41
3.4.	MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	42
3.5.	MATERIAL EXPERIMENTAL	43
3.6.	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	43
3.6.1.	REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS	43
3.6.2.	EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO	44
3.6.3.	PCR	44
3.6.4.	SEROTIPIFICACIÓN.....	45
3.6.4.1.	Serotipificación somática	45
3.6.4.2.	Serotipificación flagelar.....	46
3.6.4.3.	Método de inversión de fases	47
3.6.4.4.	Determinación de los serotipos de las cepas aisladas	48
IV.	RESULTADOS	49
V.	DISCUSIÓN.....	52
VI.	CONCLUSIONES	59
VII.	LITERATURA CITADA.....	60
VIII.	ANEXOS	68

RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades zoonóticas de transmisión alimentaria más importante, por su alta frecuencia y por ser muy extendida a nivel mundial. Los alimentos de origen aviar son la fuente de infección más usual de *Salmonella*. Por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar molecular y serológicamente *Salmonella* spp. presentes en aislados de huevos, canales y vísceras aviares. Se evaluaron un total de 46 aislados de origen aviar identificados como *Salmonella* spp. mediante cultivos y pruebas bioquímicas en el periodo 2012-2017, procedentes de diferentes distritos de la ciudad de Lima. Estos aislados son conservados en el cepario de Laboratorio de Microbiología y Parasitología Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se reactivaron las cepas, y se reconfirmaron las colonias sospechosas a *Salmonella* spp. mediante el cultivo en medios selectivos. Posteriormente se procedió a realizar PCR a todas las muestras sospechosas como método de diagnóstico genético de *Salmonella*. Se detectó el gen de invasividad *invA*, que es un gen involucrado con la virulencia de *Salmonella*. Se realizó la serotipificación con antisueros polivalentes y monovalentes para serogrupo y serovar, en el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS), finalmente se determinó las serovariedades de acuerdo a el Esquema propuesto por Kauffmann -White. Las 46 cepas (100%) evaluadas evidenciaron bandas de peso molecular correspondientes al gen *invA* (244pb). Todas las cepas fueron identificadas mediante serotipificación, obteniendo: *Salmonella* Infantis (34.8%), *S. Pullorum* (34.8%), *S. Gallinarum* (15.2%), *S. Enteritidis* (8.7%) y *S. Typhimurium* (6.5%). Los resultados en el presente estudio describen la predominancia de los serovares circulantes en las muestras aviares, que ofrecen información base en la epidemiología de la enfermedad y su implicancia en la salud pública.

Palabras clave: *Salmonella*, Serovar, gen *invA*, PCR, serotipificación

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most important food-borne zoonotic diseases, due to its high frequency and because it is widespread worldwide. Food of avian origin is the most common source of *Salmonella* infection. Therefore, the objective of the present study was to molecularly and serologically identify *Salmonella* spp present in isolates of avian eggs, carcasses and viscera. A total of 46 isolates of avian origin identified as *Salmonella* spp. through cultures and biochemical tests in the period 2012-2017, from different districts of the city of Lima. These isolates are kept in the stock of the Laboratory of Microbiology and Parasitology section of Bacteriology and Mycology of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos. The strains were reactivated, and colonies suspected of *Salmonella* spp. were reconfirmed by culturing on selective media. Subsequently, PCR was carried out on all suspicious samples as a method of genetic diagnosis of *Salmonella*. The invasiveness gene *invA* was detected, which is a gene involved with the virulence of *Salmonella*. Serotyping was performed with polyvalent and monovalent antisera for serogroup and serovar, in the Enteropathogens Laboratory of the National Institute of Health (INS), finally the serovarieties were determined according to the Scheme proposed by Kauffmann -White. The 46 strains (100%) evaluated showed molecular weight bands corresponding to the *invA* gene (244bp). All the strains were identified by serotyping, obtaining: *Salmonella* Infantis (34.8%), *S. Pullorum* (34.8%), *S. Gallinarum* (15.2%), *S. Enteritidis* (8.7%) and *S. Typhimurium* (6.5%). The results in the present study describe the predominance of circulating serovars in avian samples, which offer basic information on the epidemiology of the disease and its implication in public health.

Key words: *Salmonella*, Serovar, *invA* gene, PCR, serotyping

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Brotes de ETA reportados en el Perú, enero-abril 2019.....	Pág. 12
Cuadro 2. <i>Salmonella</i> : especies, subespecies, serovariedades y su hábitat usual.	Pág. 27
Cuadro 3. Condiciones para el crecimiento de <i>Salmonella</i>	Pág. 31
Cuadro 4. Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de <i>Salmonella</i>	Pág. 32
Cuadro 5. Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i>	Pág. 33
Cuadro 6. Cebadores usados en el PCR.	Pág. 42
Cuadro 7. Formulas antigénicas obtenidas según el esquema de Kauffman – White.....	Pág. 48
Cuadro 8. Serotipos de <i>Salmonella</i> de origen aviar identificados según el esquema de Kauffman-White.	Pág. 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fuentes de <i>Salmonella enterica</i>	Pág. 13
Figura 2: Vías de contaminación del huevo por <i>Salmonella</i> spp.	Pág. 17
Figura 3: PCR para la detección del gen <i>invA</i>	Pág. 48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Purificación de DNA genómico de Bacterias Gram negativas**Pág. 66**

Anexo 2: Lista de cepas en estudio.....**Pág. 68**

I. INTRODUCCIÓN

En términos generales, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) significan un diverso grupo de patologías transmitidas durante la ingesta de agua o alimentos contaminados con agentes químicos o microbiológicos (Kooper *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2010). En términos particulares, la Salmonelosis constituye una de las ETA más comunes en el mundo, la cual afecta tanto a los animales como a seres humanos. Se reconoce que las aves de corral, ganado vacuno y porcino constituyen sus principales reservorios, así como los productos cárnicos que derivan de ellos, los cuales en conjunto representan un riesgo para la salud pública (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La salmonelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Salmonella*, la cual comúnmente está asociada a cuadros diarreicos en humanos. Este género está conformado por bacilos cortos gramnegativos, no esporulados, anaerobios facultativos y móviles (con la excepción de los serovares Gallinarum y Pullorum). Dichos agentes se agrupan dentro las especies en *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; las cuales, a su vez se subdividen en más de 2579 serovariedades, en donde predominan los serovares de la subespecie *enterica*, en los aislados de muestras clínicas pertenecientes a animales y humanos (Grimont y Weill, 2007; Caffer *et al.*, 2008).

Las serovariedades no tíficas de *Salmonella spp.* cuentan con una amplia distribución a nivel mundial y representan un importante riesgo zoonótico, las cuales tienen como fuentes habituales de infección a la carne, derivados cárnicos y huevos de aves de corral; quienes representan el mayor reservorio de *Salmonella spp.* descrito; a expensas de otros productos cárnicos de origen porcino, bovino y ovino (Doyle y Buchanan, 2013).

Las serovariedades patógenas tienen la capacidad de colonizar tejidos del aparato reproductor de las gallinas, permitiendo una posterior infección en la etapa de formación de los huevos. También puede darse la infección de los huevos con materia fecal luego de la postura, debido a la excreción de *Salmonella* en la materia fecal por parte de las aves portadoras. Si bien

las canales de aves se pueden contaminar durante el proceso de beneficio, transporte y comercialización, el riesgo de contaminación se incrementa cuando existen deficiencias en las condiciones sanitarias durante dichos procedimientos (Terzolo, 2009; Zambrano *et al.*, 2013).

El papel de *Salmonella* en la cadena alimentaria mundial, sus repercusiones actuales y proyectadas frente a la salud pública, es un gran motivo de preocupación sanitaria. Es por ello que el empleo de métodos sensibles, específicos, rápidos y replicables para la detección de dichos agentes en muestras clínicas y en alimentos es fundamental para su identificación, monitoreo, prevención y control. Dentro de dichos métodos, las técnicas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) representan una herramienta diagnóstica que exhibe una alta sensibilidad para la detección de patógenos virales, bacterianos, micóticos y protozoarios, la cual está extensamente difundida en múltiples latitudes dentro de la microbiología diagnóstica (Abd El Tawwab *et al.*, 2013).

Durante el proceso de adaptación, la *Salmonella* ha generado una variedad de mecanismos para colonizar, invadir, replicar y sobrevivir dentro del huésped, ello se ha logrado, en parte, debido al desarrollo de un sistema de secreción de proteínas asociadas con la invasión en los diferentes serotipos de patógenos, el cual depende de un componente esencial codificado por el gen *invA*, presente en todas las cepas virulentas de *Salmonella*. Es por ello, que se estableció la presencia del gen *invA* como una diana genética de *Salmonella* en métodos de PCR (Espinal *et al.*, 2006; Martínez, 2007).

La identificación molecular de regiones conservadas del gen *invA* en cepas de *Salmonella*, permite agrupar aislados patógenos los cuales pueden ser caracterizados mediante ensayos serológicos. La serotipificación permite determinar la composición antigénica del organismo, para luego agruparlos en serovariedades; ello mediante el empleo del esquema de Kauffmann-White (Caffer *et al.*, 2008). Su uso permite la detección rápida de brotes infecciosos, proporciona información crítica sobre cómo controlar y prevenir eventos similares en el futuro; además de ser un pilar esencial para las vigilancias epidemiológicas, como la valoración de la efectividad de las medidas de control adoptadas frente a un brote (Herikstad *et al.*, 2002).

Debido a lo anteriormente mencionado, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia del gen de invasividad *invA* en cepas sospechosas de *Salmonella* spp. de aislados de origen aviar como método de confirmación de cepas patógenas, para su posterior caracterización mediante el esquema de serotipificación propuesto por Kauffmann -White.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), síndrome producido por la ingesta de agua o alimentos contaminados con agentes químicos o microbiológicos; son un problema de salud pública creciente en el mundo debido al crecimiento en cuanto a su ocurrencia, la aparición de nuevas vías de transmisión, nuevos grupos de personas vulnerables y el incremento de la resistencia a los antimicrobianos que desarrollan dichos patógenos (González y Rojas, 2005; Kooper *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2010).

Las ETA causan un alto porcentaje de morbilidad a nivel mundial, estimándose que, en el 2005, 1,5 millones de personas murieron siendo el 70% atribuidas a las ETA. Produce un importante impacto negativo en los gastos en el sector salud, así como en las actividades económicas que tienen relación con la producción alimentaria. (Flint *et al.*, 2005; Buzby *et al.*, 2009).

Se caracterizan por una amplia variedad de manifestaciones clínicas generalmente gastrointestinales, como náuseas, vómitos, diarreas, dolor en el abdomen y fiebre; en los casos más severos hay complicaciones como septicemia, meningitis, abortos o la muerte (Soto y Estrada, 2016)

Un número aproximado de 250 agentes causan las ETA, encabezando la lista está: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., y *Yersinia* sp. (Muriel, 2008).

En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que cada año 48 millones de personas enferman por una ETA, 128 000 son

hospitalizados y 3 000 mueren (CDC, 2018). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC), reportaron en el 2012 un total de 55 453 casos, 5 118 hospitalizaciones y 41 defunciones. Ambas entidades observaron que las ETA producidas por *Salmonella*, en la Unión Europea, han ido en aumento en un 3% desde el año 2014.

En el Perú, entre los años 2014 y 2018, se reportó a nivel nacional un total de 234 brotes de ETA, siendo el promedio por año 47 brotes, 6 098 casos, 1 311 hospitalizados y 29 muertes. Lima fue el departamento con mayor número de brotes (22.2%). Este reporte menciona que la vigilancia epidemiológica realizada hasta el primer cuatrimestre del año 2019, reportó que el 22.7% (5/22) tuvieron como agente causal a una coinfección de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, el 9.1% (2/22) por *Salmonella* spp. como único agente y el 9.1% (2/22) aún no han sido determinados (Cuadro 1) (Borgoño, 2019).

Cuadro 1. Brotes de ETA reportados en el Perú, enero-abril 2019

Agente causal	Brotes de ETA de 2019*	%
<i>Salmonella</i>	2	9.1
<i>Salmonella</i> / <i>E. coli</i>	5	22.7
Sustancias químicas	0	0.0
En investigación	2	9.1
No se determinó	13	59.1
Total	22	100.0

Fuente: Boletín Epidemiológico del Perú (Borgoño, 2019).

2.1.1. SALMONELOSIS HUMANA

La salmonelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Salmonella*, asociadas con mucha frecuencia a cuadros diarreicos. Este mal sigue siendo una de las causas más importantes de morbilidad en niños y ancianos (Romero, 2007). Los casos de salmonelosis humana se limitan casi por completo a los serotipos de subespecies *enterica*. Los principales reservorios de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado vacuno y porcino (Figura 1). Diversos estudios han evaluado la presencia de *Salmonella*

en animales salvajes y de zoológico; la *Salmonella* es considerada como parte de la microbiota de los reptiles, por lo tanto el contacto con ellos o el consumo de su carne, se consideran una fuente de salmonelosis humana (Lamas *et al.*, 2018). La transmisión se da por la ingesta del microorganismo en un alimento o subproducto proveniente de un animal infectado o contaminado por heces del mismo (Uribe y Suárez, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2008).

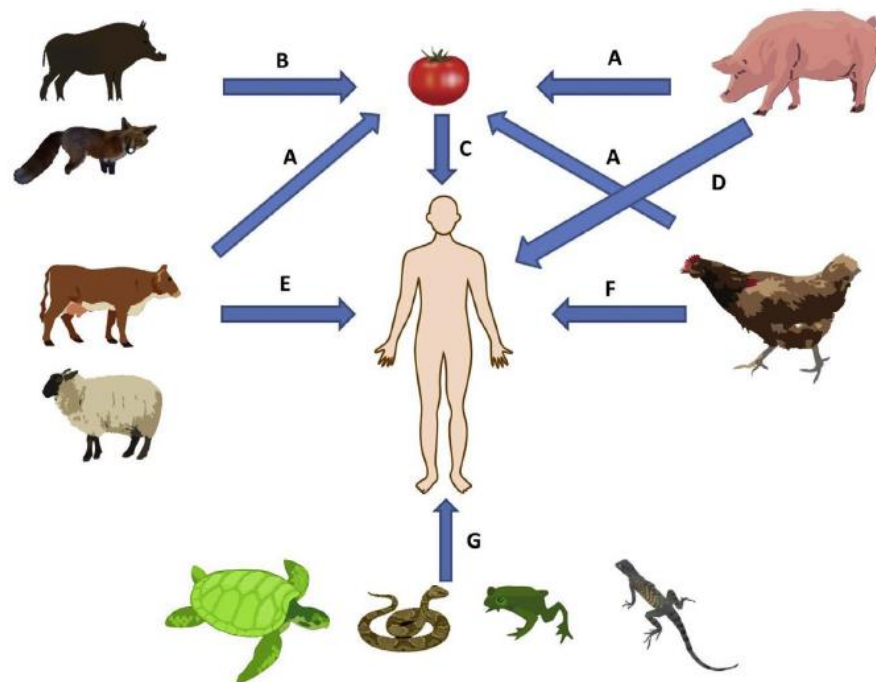


Figura 1. Fuentes de *Salmonella enterica*. Heces de animales infectados pueden contaminar el agua de riego de alimentos destinados al consumo por el hombre (A). Animales salvajes pueden contaminar productos alimenticios a través de sus heces. (B). Alimentos de origen vegetal pueden ser fuente de *Salmonella* e ingresar a la cadena alimenticia y ser consumido por el hombre (C). La carne de cerdo es una fuente importante de *Salmonella* (D). La carne de bovino y ovino son fuente de *Salmonella*, así como la leche y el queso (E). Las aves y sus productos (Huevos) se consideran como la principal fuente de salmonelosis humana (F). Los animales de sangre fría son fuente importante de *Salmonella*, el consumo de sus carnes y el uso de estos como mascotas, son vías de transferencia al humano (G) (Lamas *et al.*, 2018).

2.1.1.1. PRESENTACIONES CLÍNICAS

Salmonella spp. produce un amplio número de manifestaciones clínicas en los seres humanos como fiebre, gastroenteritis, bacteriemia, infecciones localizadas, y estado de portador crónico (Uribe y Suarez, 2006).

El ingreso de este microorganismo es a través de la vía oral, generalmente acompañado de alimentos o bebidas contaminadas. La infección en humanos se produce con una dosis infecciosa de 10^5 a 10^8 UFC (Brooks *et al.*, 2011). La presencia de salmonelas viables en el tracto digestivo humano, confirma la evasión exitosa de las defensas del huésped por las bacterias ingeridas. La saliva, la acidez gástrica, secreciones mucoides de las células caliciformes intestinales, el peristaltismo intestinal y el desprendimiento de células epiteliales lumbinales se oponen sinérgicamente a la colonización de las bacterias en la mucosa intestinal. Adicionalmente a estos obstáculos está la inmunidad intestinal local y la respuesta diarrogénica. El fallo de estos sistemas de defensa del huésped para contener la invasión de la *Salmonella*, puede generar septicemia y otras condiciones clínicas crónicas (Doyle y Beuchat, 2007).

De acuerdo a Betancor y Yim (2012), las cepas de *Salmonella enterica* que causan infecciones en humanos pueden dividirse en:

- **Salmonellas tifoideas:** afectan potencialmente a humanos y producen una infección sistémica severa denominada Fiebre entérica o Fiebre tifoidea. Los serotipos que producen esta infección son Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B y C.
- **Salmonellas no tifoideas:** producen cuadros de gastroenteritis y pocas veces llegan a travesar la barrera intestinal. Aquí pertenecen los cientos de serotipos restantes de *Salmonella*, teniendo un amplio rango de hospedadores posibles, siendo éstas las más difundidas y consideradas como zoonosis.

2.1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Hasta hace algunos años *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, denominada también como *Salmonella* Typhimurium (la nomenclatura puede usarse simplificada con fines prácticos, considerándose los nombres de los serotipos como nombres de especies), fue el principal agente causal de enfermedad en pollos y de toxoinfección alimentaria en humanos; en los años 70's lo fue *Salmonella* Hadar, posteriormente desde el año 1980 muchos países se vieron afectados por la *Salmonella* Enteritidis; siendo estos los más

comunes serovares que infectan a aves (produciendo un estado de portador asintomático) y causantes de morbimortalidad en humanos (Suárez y Mantilla, 2000).

Actualmente, se considera a la *S. Infantis* como un serotipo emergente a nivel mundial, esto es reflejado por el aumento de casos humanos de salmonelosis y por la mayor prevalencia en las aves de corral y pollos de engorde, generándose una importante pérdida en la economía para la industria avícola (EFSA-ECDC, 2015b; Vallejos *et al.*, 2019). En la Unión Europea, *S. Infantis* fue el serovar más comúnmente reportado en granjas de pollo de engorde y en canales de aves, extendiéndose de los animales a humanos a través de la cadena alimentaria, representando una preocupación en la salud pública (Pate *et al.*, 2019).

Reportes indican que en Estados Unidos, entre los años 2009 y 2015, *Salmonella* spp. fue la segunda etiología más reportada con 896 casos (30%) y 23 662 enfermos. El informe destaca que los brotes asociados a alimentos fueron casos de salmonelosis por consumo de huevos contaminados (2 422 casos), vegetales (2 203 casos) y carne de pollo (1 941). Siendo Enteritidis el serotipo más común (CDC, 2015; Dewey *et al.*, 2018).

En Centroamérica, México es el país más afectado por la salmonelosis. La Secretaría de Salud de dicho país dió un reporte en el que muestra un promedio de 68 000 casos al año de infecciones causadas por *Salmonella* spp., siendo *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium los serovares más frecuentemente aisladas de niños con diarreas (Rincón *et al.*, 2011).

En Brasil, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Mbandaka y *Salmonella* Javiana son algunos de los serovares frecuentemente aislados en muestras de humanos, aves de corral y otras fuentes (Gama *et al.*, 2003).

En Uruguay, *Salmonella* es el principal agente causal de ETA, siendo responsable de más del 30% del total de los brotes registrados por el Ministerio de Salud Pública entre el 2000 y 2009 (Betancor y Yim, 2012)

En Perú, entre los años 2003 y 2007, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública del Ministerio de Salud (MINSA) identificó 134 brotes de ETA, de los cuales 57 (42,5%) se relacionaron clínicamente con casos agudos de salmonelosis (Zamudio *et al.*, 2008).

En el año 2010, la Red Nacional de Laboratorios en el Perú realizó una vigilancia bacteriológica en el cuál se detectó un incremento de casos de *Salmonella* en aislados de origen humano y aislados de los alimentos involucrados en los casos, donde el mayor número de muestras provenían de pacientes pediátricos, y siendo las muestras remitidas

por diversos hospitales de la ciudad de Lima. Del total de muestras evaluadas, el Instituto Nacional de Salud (INS), identificó 33 aislados como *Salmonella enterica* serovar Infantis: 24 de casos clínicos y 9 de alimentos (preparados con huevos y productos cárnicos avícolas), siendo esta la tercera serovariedad más frecuente en el Perú en los últimos años (Zamudio *et al.*, 2011).

2.1.1.3. PAPEL DE LOS ALIMENTOS DE ORIGEN AVIAR Y SUS DERIVADOS

Las salmonelas son consideradas como agentes zoonóticos por ser patógenas para los humanos, y tienen gran relevancia sanitaria en el comercio internacional, especialmente en la industria de productos destinados al consumo humano o animal, tales como carnes, huevos y harinas (Terzolo, 2009). Las infecciones producidas por serovares de *Salmonella* spp. no tíficas ha ido en aumento debido a la apertura económica y la globalización, ya que el consumo de carne de pollo, huevos y subproductos se ha incrementado en todo el mundo (Uribe y Suárez, 2006).

Muchas serovariedades de *Salmonella* que afectan a las aves están relacionadas con casos de salmonelosis en humanos, siendo importante *Salmonella* Enteritidis debido a su participación como patógeno transmitido por el consumo de huevos. También se han tenido reportes de infecciones humanas por el consumo de alimentos a base de huevo crudo o elaborados con deficiente cuidado, siendo las serovariedades implicadas *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Infantis (Terzolo, 2009).

Existe una gran probabilidad de que todas las canales de las aves estén infectadas. La presencia de salmonelas en el producto cárnico crudo puede ser menor al inicio de la cadena e incrementar como resultado de un inadecuado manejo y de las deficientes condiciones de bioseguridad, como son la incorporación de aves enfermas, alimentos contaminados o manipulación por parte de operarios contaminados (Grados, 1974; Uribe y Suárez, 2006).

Los distintos serovares de *Salmonella* difieren en su habilidad para ocasionar una contaminación en la cáscara o el contenido del huevo. En ese sentido, Arnold *et al.* (2012) determinaron una capacidad significativamente diferente de contaminación entre serovares. En su estudio, observaron que *S. Enteritidis* provocó una mayor tasa de contaminación del contenido del huevo y una menor tasa de contaminación de las cáscaras por gallina infectada (0.32% y 0.34%, respectivamente) comparada con *S. Typhimurium* (0.23% y 0.94 %, respectivamente). En parte, esto puede ser debido a que se ha descrito experimentalmente que *Salmonella* Enteritidis tiene una mayor capacidad para colonizar

los órganos reproductivos y huevos que otros serotipos zoonóticos (como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Montevideo), en gallinas ponedoras (Okamura *et al.*, 2001). La capacidad de transmitirse verticalmente al contenido de los huevos lo comparten *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Enteritidis, pues derivan de un ancestro en común (Yao *et al.*, 2016).

Existen tres posibles vías por las cuales *Salmonella* spp. podría contaminar los huevos (Figura 2) :

- **Transmisión vertical:** transovárica, desde los ovarios y oviductos infectados, logrando infectar a los huevos antes de la formación del cascaron o durante el pasaje por el oviducto o vagina (Keller *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2001).
- **Transmisión horizontal:** durante la postura, se lleva a cabo cuando la *Salmonella* penetra el cascaron que ha sido contaminado con las heces de las gallinas al momento del pasaje del huevo por la cloaca (De Reu *et al.*, 2006).
- **Transmisión lateral:** durante la manipulación o el almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa (Kaiser y Lamont, 2001).

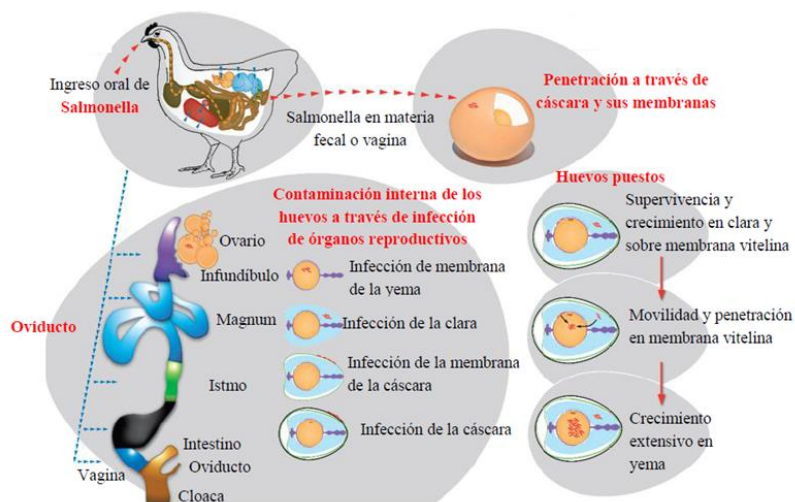


Figura 2. Vías de contaminación del huevo por *Salmonella* spp. Adaptado de Soria (2011).

La EFSA en el 2013 reportó que *S. Infantis* fue el serovar más frecuentemente reportado en aislamientos de aves (parvadas reproductoras, pollos de engorde y gallinas ponedoras) (22.7%) (EFSA-ECDC, 2015a).

En los años 2005 y 2006, la prevalencia de *S. Infantis* fue de 68% en pollos de engorde húngaros, además se demostró mediante una caracterización de genes la resistencia a múltiples fármacos que este serotipo poseía (Nógrády *et al.*, 2008).

En Croacia, se realizó un muestreo a mercados municipales, implementado como parte de la inspección sanitaria del Ministerio de Salud, evaluando canales frescas y congeladas de aves. De 474 muestras de carne de pollo, 51 fueron positivos a *Salmonella* spp. mientras que *Salmonella* *Infantis* fue el serotipo aislado más frecuente (45/51, 88.2%) (Hengl *et al.*, 2016).

En Brasil, se examinaron 2 679 carcasas de pollos provenientes de varias ciudades, siendo la prevalencia de *Salmonella* spp. de 2.7%. El estado de Sao Paulo presentó el 50.6% de muestras positivas. Los serovares aislados más frecuentes fueron *Salmonella* *Enteritidis* (48.8%), *Salmonella* *Infantis* (7.6%), *Salmonella* *Typhimurium* (7.2%) y *Salmonella* *Heidelberg* (6.4%) (Medeiros *et al.*, 2011).

En Colombia, se estimó la prevalencia de *Salmonella* spp. en huevos comercializados en la ciudad de Ibagué, se colectaron un total de 1 705 huevos y 341 muestras (pool de 5 huevos) y la prevalencia fue de 2.93% (Mogollón *et al.*, 2015). Posteriormente, en el 2015, se obtuvieron 96 muestras (pools de 5 huevos) de diferentes localidades de Bogotá, de los cuales se detectó un 9.4% de muestras positivas para *Salmonella* spp. (Castañeda *et al.*, 2015).

En Perú, se llevó a cabo un estudio en el que se evaluaron huevos procedentes de 3 mercados de Lima para la evaluación de la selectividad del agar Xilosa-Lisina-Tergitol4, encontrándose un 4.4% de estos *Salmonella* spp. en cáscara y un 1.1% en contenido; los serovares encontrados fueron *Salmonella* *Djugu* (90.5%) y *Mbandaka* (9.5%) (Lévano y López, 2001). En el 2012, se determinó la presencia de *Salmonella* spp. en pollos de engorde de centros de beneficio clandestinos de la ciudad de Lima, de 180 muestras el 30.6% (55) fueron positivas a *Salmonella* spp. (Zambrano *et al.*, 2013).

2.2. SALMONELOSIS AVIAR

Múltiples factores pueden afectar la colonización de *Salmonella* en aves, como la edad y la susceptibilidad genética, el estrés, nivel de exposición con el patógeno y la cepa o serovar de *Salmonella* (Foley *et al.*, 2011).

Las infecciones producidas en las aves por este género se pueden agrupar en dos categorías (Terzolo, 2009):

- **Salmonelosis no zoonótica (Tifosis y Pullorosis):** producidas por dos cepas no móviles específicas de las aves, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, y que con algunas excepciones no causan enfermedad en los humanos.
- **Salmonelosis zoonótica (Paratifosis):** producidas por cepas móviles, considerados como paratíficos.

2.2.1. PRESENTACIONES CLÍNICAS

2.2.1.1. Pullorosis

El agente fue descrito por primera vez en 1899 por Rettger, que en 1909 lo nombró *Bacterium Pullorum*, denominación que finalmente cambió a *Salmonella Pullorum*. Es una dolencia que inicialmente era conocida como diarrea blanca bacilar, pero la diarrea blanca no siempre es un signo clínico evidente (Revolledo y Piantino, 2009).

- Etiología y transmisión

Enfermedad específica de las aves, producido por *Salmonella Pullorum*. Causa alta tasa de mortalidad (potencialmente cercana al 100%) en pollitos y pavos jóvenes dentro de las primeras semanas de edad; las aves adultas pueden tener una mortalidad alta, pero con frecuencia no presentan signos clínicos, teniendo el papel de portadoras asintomáticas, diseminando el agente a través de sus excreciones (Parra *et al.*, 2002; Dinev, 2010). La transmisión puede ser vertical (transovárica), también ocurre a través del contacto directo o indirecto con aves infectadas. La infección transmitida a través de huevos contaminados generalmente resulta en la muerte de las aves durante los primeros días de vida (Allen *et al.*, 2016).

Alimento, agua y cama contaminadas, pueden ser fuentes importantes del agente, además el personal que manejan el alimento, los compradores y visitantes que van de

granja en granja, pueden portar la infección. Por ello es importante la desinfección de zapatos, manos y ropa; de igual manera, los camiones, transportes, sacos de alimentos, aves silvestres, mamíferos y moscas pueden ser diseminadores mecánicos de *Salmonella* (Calnek *et al.*, 2000).

- **Signos clínicos y lesiones**

La enfermedad afecta a aves de todas las edades, pero el grupo que posee menos de 4 semanas (2 a 3 semanas) de edad son las más afectadas, en algunos casos pueden morir en la incubadora poco después de la eclosión (Allen *et al.*, 2016). Las aves se presentan agrupadas, débiles, pérdida o disminución del apetito, dificultad para respirar, deshidratación, diarrea con adherencia de las plumas alrededor de la cloaca (Torrubia *et al.*, 2014).

Las lesiones en aves jóvenes generalmente son: reabsorción incompleta del saco vitelino, nódulos grises en bazo, hígado, corazón, pulmones, molleja e intestinos; a veces se observa material firme en el ciego y placas elevadas en la mucosa del intestino delgado. El edema de las articulaciones tibio-tarsales puede ser un signo asociado frecuentemente (Torrubia *et al.*, 2014; Allen *et al.*, 20016). Los portadores adultos generalmente no tienen lesiones macroscópicas, pero pueden tener pericarditis nodular, peritonitis fibrinosa o hemorrágica, folículos ováricos atrofiados con contenido caseoso (Allen *et al.*, 2016).

- **Diagnóstico**

Las lesiones pueden ser muy sugestivas pero el diagnóstico debe confirmarse mediante el aislamiento e identificación y serotipado de la *Salmonella Pullorum*. Las infecciones en aves maduras pueden identificarse mediante pruebas serológicas, seguidas de una evaluación de necropsia complementada con un cultivo microbiológico y tipificación para confirmar (Allen *et al.*, 2016). Un diagnóstico presuntivo puede ser realizado en base a la historia del lote, signos clínicos, mortalidad y lesiones. Los resultados negativos no deberían ser considerados adecuados para dar un diagnóstico definitivo, debido a que puede existir un atraso de 3 a 10 días de la aparición de anticuerpos aglutinantes; de la misma manera, los resultados positivos deben ser interpretados con cuidado por las reacciones cruzadas con otras salmonelas, como *Salmonella Enteritidis* (Revolledo y Piantino, 2009).

- **Tratamiento y Control**

No se recomienda el tratamiento de las poblaciones infectadas, ya que se puede perpetuar el estado de portador. Los programas de control y erradicación están basados en la identificación, sacrificio y descarte de las aves seropositivas dentro del lote (Revolledo y Piantino, 2009; Allen *et al.*, 2016).

2.2.1.2. Tifosis aviar

Causada por *Salmonella Gallinarum*, reconocida por primera vez en 1888, fue denominado como *Bacillus gallinarum* y más tarde cambió a *Bacillus sanguinarium*. El nombre de Tifoidea aviar se usó en 1902, en 1954 se incluyó el control de la tifoidea aviar en el programa National Poultry Improvement Plan (NPIP) de los Estados Unidos, por ello la erradicación de la enfermedad en aves comerciales en dicho país se evidencia en la baja incidencia que informan a cada año (Calnek *et al.*, 2000).

- **Etiología y transmisión**

Enfermedad septicémica aguda o crónica, producida por *Salmonella Gallinarum*, es un serotipo inmóvil con características muy semejantes a las de *Salmonella Pullorum*; bioquímicamente, presentan algunas diferencias (Allen *et al.*, 2016).

Se transmite a través del huevo y produce lesiones similares a las ocasionadas por *Salmonella Pullorum*, pero existe una tendencia mayor a propagarse entre las aves en crecimiento; la mortalidad en las aves jóvenes es similar a la observada en la infección por *Salmonella Pullorum*, pero puede ser mayor en las aves adultas (Revolledo y Piantino, 2009).

Aves silvestres, mamíferos y los insectos pueden actuar como vectores mecánicos o biológicos; el ácaro rojo de las gallinas (*Dermanyssus gallinae*) parece estar involucrado en la propagación de la tifosis aviar (CFSPH, 2019).

- **Signos clínicos y lesiones**

Los signos clínicos y lesiones son similares a los observados con la infección por *Salmonella Pullorum*, las aves más adultas son las más afectadas, y pueden estar pálidas, deshidratadas, con dificultad para respirar y presentan diarrea amarillenta (Revolledo y

Piantino, 2009). La disnea o jadeo se dan como resultado de las lesiones pulmonares, los sobrevivientes pueden presentar retraso en el crecimiento y se observan mal emplumados (Calnek *et al.*, 2000).

En la necropsia se puede observar el hígado aumentado de tamaño, friable y muchas veces teñido de bilis, con o sin focos necróticos y hemorrágicos; aumento de tamaño del bazo y los riñones (Dinev, 2010; Allen *et al.*, 2016).

- **Diagnóstico**

El diagnóstico debe confirmarse mediante aislamiento, identificación y serotipado de *Salmonella* Gallinarum (Revolledo y Piantino, 2009, Allen *et al.*, 2016).

- **Tratamiento y control**

El tratamiento y control son similares a los de la Pullorosis. El control se basa en pruebas serológicas de rutina para garantizar que las aves no están infectadas. Además, se deben tomar medidas de gestión y bioseguridad para reducir la introducción de *Salmonella* Gallinarum a partir de piensos, agua, aves silvestres, roedores, insectos o personas (Revolledo y Piantino, 2009).

2.2.1.3. Paratifosis

- **Etiología y transmisión**

Producida por serotipos móviles de *Salmonella* que no tienen hospedadores específicos, ya que pueden infectar a una gran variedad de huéspedes, se consideran patógenas para el hombre y muchas especies animales; responsables de diferentes cuadros clínicos, desde procesos subclínicos con portadores asintomáticos, hasta llegar a ocasionar procesos entéricos leves o septicemia, muchas veces supone la muerte del individuo afectado (Torrubia *et al.*, 2014).

La transmisión ocurre a través de las aves infectadas, ambientes contaminados o roedores infectados; las reproductoras infectadas transmiten a su progenie, además la penetración de los microorganismos dentro del huevo debido a la contaminación fecal es una vía muy frecuente (Allen *et al.*, 2007).

- **Signos clínicos y lesiones**

La intensidad de los signos clínicos está directamente relacionada con la virulencia del serotipo que afecta a la parvada (Revolledo y Piantino, 2009).

La enfermedad suele asociarse a mortalidad embrionaria o al nacimiento, los pollitos se presentan muy débiles y mueren en las 2 primeras semanas de vida (Torrubia *et al.*, 2014). La mortalidad se limita con mayor frecuencia a las primeras semanas de edad, la depresión, el crecimiento deficiente, debilidad, diarrea y la deshidratación son características de la enfermedad, aunque estos signos clínicos no son distintivos. Las infecciones ocasionalmente se localizan en el ojo o los tejidos sinoviales, produciendo ceguera o conjuntivitis (Dinev, 2010; Allen *et al.*, 2016).

Las lesiones pueden incluir un hígado agrandado con necrosis focal, saco vitelino no absorbido, pericarditis y perihepatitis con adherencias, enteritis con lesiones necróticas en la mucosa y núcleos cecales, artritis y aerosaculitis. Por el contrario, puede no haber lesiones debido a la muerte aguda causada por septicemia (JAEC, 2000; Allen *et al.*, 2016).

En muchos casos, las aves presentan colonización intestinal sin observarse signos clínicos, por lo tanto, eliminan por vía fecal los microorganismos de forma intermitente y causan la contaminación de los huevos en su paso por la cloaca, así como la granja (Torrubia *et al.*, 2014).

- **Diagnóstico**

El aislamiento, identificación y serotipado del agente casual son esenciales para el diagnóstico (Allen *et al.*, 2016). El aislamiento se hace a partir del cultivo de algunos órganos de las aves, y de tomas de muestra del ambiente; como diversos serovares poseen la capacidad de provocar bacteremia, varias vísceras son usadas de forma rutinaria: el hígado, la vesícula biliar, el bazo, el corazón, el ovario y el saco vitelino son órganos elegidos para el aislamiento. La detección rápida y eficaz de los lotes de aves afectados por *Salmonella* spp. se ha vuelto fundamental en el esfuerzo por reducir la frecuencia de transmisión entre los lotes de aves de corral y sus consumidores (Revolledo y Piantino, 2009).

- **Tratamiento y control**

El uso de antibióticos es muy debatido, varios agentes antibacterianos ayudan a prevenir la mortalidad, pero no pueden eliminar la infección de la parvada y pueden provocar resistencia a los medicamentos. La vacunación no ofrece protección completa, y debe usarse en combinación con otras medidas de control para reducir la incidencia de infección por *Salmonella*. Las medidas generales de control para las salmonelas paratíficas incluyen la fumigación de huevos para incubar, la limpieza y desinfección de gallineros, el control de roedores y el uso de productos de exclusión competitiva. El mantenimiento de las aves de corral en confinamiento y exclusión de mascotas, aves silvestres y roedores ayudan a prevenir la introducción de infecciones. (Allen *et al.*, 2016).

Debido a las numerosas formas posibles de contaminación de las aves y sus productos, corroboradas por la transmisión vertical y horizontal de *Salmonella*, los programas de prevención y control son laboriosos y costosos, pero esenciales. Como las bacterias pueden entrar en las granjas y perpetuarse verticalmente, o ser llevadas constantemente por la contaminación ambiental, la erradicación completa de los serovares paratíficos en granjas avícolas sigue siendo un problema a pesar de las técnicas disponibles (Revolledo y Piantino, 2009).

2.2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PARATIFOSIS AVIAR

Cuando *Salmonella* Enteritidis ingresa por primera vez a las granjas, las aves no manifiestan síntomas y lesiones, posteriormente las aves reproductoras infectadas engendran pollitos infectados, esta nueva población manifiesta una baja mortalidad. Es así como la enfermedad se torna asintomática y sin ser detectada se difunde rápidamente (Terzolo, 2009).

La infección por *Salmonella* Enteritidis en aves es un proceso complejo que incluye la colonización intestinal, la invasión y la diseminación sistémica a órganos como el hígado y el bazo. En gallinas reproductoras adultas, la colonización de los órganos en el tracto reproductivo y la contaminación interna de los huevos antes de la ovoposición es un resultado epidemiológicamente significativo de la infección (Ricke y Gast, 2017).

Hay reportes de infecciones en humanos donde otras serovariedades fueron implicadas, como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Infantis (Terzolo, 2009).

En el 2014, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) evaluó, mediante hisopados de arrastre por la superficie del suelo, 550 granjas avícolas tecnificadas distribuidas en función al tipo de explotación en 272 granjas de carne, 194 granjas de postura comercial y 84 granjas de reproductores en 16 regiones del país. Los resultados detectaron una predominancia de *Salmonella* Infantis en la producción comercial de aves: la prevalencia de *Salmonella* Infantis fue del 91.43% en granjas de carne, mientras que en granjas de postura comercial 54.84% y en granjas de reproductoras del 60% (Valderrama *et al.*, 2014).

2.3. GÉNERO *Salmonella*

2.3.1. ANTECEDENTES

El nombre *Salmonella* fue propuesto por Lignières en el año 1900, en honor al Médico Veterinario Daniel Elmer Salmon, que junto a Theobald Smith, hicieron la primera descripción de esta bacteria en 1885. Aislaron la primera *Salmonella* proveniente del intestino de cerdos que padecían de peste porcina clásica, ellos llegaron a pensar que era el agente etiológico de la enfermedad mencionada (Brands, 2006; Stanchi *et al.*, 2007).

2.3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los microorganismos del género *Salmonella* se caracterizan por ser bacilos gram negativos anaerobios facultativos. Son de corta longitud (0.7 a 1.5 x 2.0 a 5 µm.), móviles por la presencia de abundantes flagelos peritricos (únicamente inmóviles *Salmonella* Gallinarum y Pullorum, y las variantes inmóviles de otros serotipos). La inmovilidad puede darse en cepas de otras subespecies de *Salmonella* que perdieron sus flagelos. No forman esporas, y se caracterizan por ser fermentadores de glucosa, catalasa positivos y oxidasa negativos (Adelantado *et al.*, 2008, Caffer *et al.*, 2008).

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en mamíferos, reptiles, aves e insectos, capaces de producir enfermedad en el hombre y los animales (Álvarez *et al.*, 2012).

2.3.3. TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Salmonella* consta de dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; de las cuales sólo la primera es de importancia clínica en animales y seres humanos, además se divide en seis subespecies en base a las diferencias bioquímicas (Cuadro 2) (Grimont y Weill, 2007). A su vez las dos especies de *Salmonella* se dividen en más de 2 500 serovariedades, mediante el esquema de Kauffman-White, definidas de acuerdo a las diferentes asociaciones de antígenos somáticos O y flagelares H (Stanchi *et al*, 2007; Caffer *et al.*, 2008).

Es común que en publicaciones científicas las serovariedades se traten como especies, siendo su escritura sin cursiva e iniciando con mayúscula. Se sugiere que en los informes se mencione la serovariedad, sin citar la especie y/o la subespecie, por ejemplo: *Salmonella* serovariedad Infantis, evitando así nombres largos como *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* serovariedad Infantis.

Las dos especies se subdividen en:

- *Salmonella enterica*, en este grupo están la mayoría de bacterias aisladas de animales de sangre caliente incluyendo al hombre. Según el esquema de Kauffman-White se divide en:
 - a) Subespecie I. *S. enterica* subsp. *enterica*
 - b) Subespecie II. *S. enterica* subsp. *salamae*
 - c) Subespecie IIIa. *S. enterica* subsp. *arizonae*
 - d) Subespecie IIIb. *S. enterica* subsp. *diarizonae*
 - e) Subespecie IV. *S. enterica* subsp. *houtenae*
 - f) Subespecie VI. *S. enterica* subsp. *indica*
- *Salmonella bongori*. Subespecie V: No causa enfermedad en los humanos, sin embargo, se le relaciona con ciertas patologías en animales.

Desde el punto de vista epidemiológico, las salmonelas también pueden ser clasificadas, distribuyéndose en tres grupos de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** conformado por salmonelas que no poseen preferencia en cuanto al huésped, por ello tienen capacidad de infectar tanto al hombre como a los animales. Aquí se encuentran el mayor número de serovariedades causantes de salmonelosis.

- **Grupo 2:** constituido por las salmonelas que infectan sólo al hombre: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Paratyphi C.
- **Grupo 3:** aquí pertenecen las salmonelas que están adaptadas a un huésped animal exclusivamente: *Salmonella* Abortusovis (a los ovinos), *Salmonella* Abortusequi (a los equinos) y *Salmonella* Gallinarum y Pullorum (a las aves) (Stanchi et al, 2007; Caffer et al., 2008).

Cuadro 2. *Salmonella*: especies, subespecies, serovariedades y su hábitat usual.

Especie	Subespecie	Nº de serovariedades	Hábitat
<i>S. enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre caliente / fría y ambiente
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)		22	Animales de sangre fría y ambiente
Total		2579	

Fuente: Grimont y Weill, 2007.

2.3.4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

La estructura antigénica de *Salmonella* consta de principalmente dos antígenos: Antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares). Algunas cepas presentan el tercer tipo de antígeno de superficie (antígeno Vi).

2.3.4.1. Antígenos somáticos (O)

Son antígenos de la pared bacteriana, compuesta por complejos de fosfolípidos y polisacáridos, constituido por 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3-4% hexosamina. Forman parte del lipopolisacárido (LPS), componente de la membrana externa de la pared de las bacterias gram negativas. Son termoestables, resistentes a ácidos diluidos y alcohol, se halla en todas las especies. Este antígeno determina la especificidad antigénica somática de la bacteria ya que es diferente en las todas serovariedades. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de: “dos puntos” y luego de números arábigos separados por comas, por ej. *S. Enteritidis* O: 1,9,12 (Caffer y Terragno, 2001).

Existen antígenos somáticos mayores o menores. La primera categoría consiste de antígenos como los factores somáticos, que son los que identifican el grupo antigénico O. Los componentes antigénicos somáticos menores tienen un poder discriminativo bajo o nulo, ya que siempre están asociados a otro antígeno somático mayor (Doyle y Buchanan, 2013).

2.3.4.2. Antígenos flagelares (H)

Antígeno constituido por la flagelina, proteína de alto peso molecular y termolábil que conforma al flagelo, cuya composición de aminoácidos es constante para un tipo de antígeno determinado. Un número reducido de serovariedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar, estas cepas se denominan monofásicas, pero la mayoría logra expresar dos fases flagelares y se denominan difásicas (Parra *et al.*, 2002).

2.3.4.3. Antígeno capsular (Vi)

Este antígeno es un polisacárido, se encuentra sólo en 3 serovariedades: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C y en algunas cepas de *Salmonella* Dublin (Parra *et al.*, 2002). Es termolábil, protege a la bacteria otorgándole resistencia fagocítica, debido a que este antígeno recubre toda la bacteria, conduce a la inaglutinabilidad con antisuero O (Stanchi *et al.*, 2007).

2.3.5. PATOGÉNESIS

La bacteria logra su ingreso al hospedador por vía digestiva a través de alimentos o bebidas contaminadas, una vez ingeridas llegan al estómago, las cepas que resisten el ambiente de pH bajo y al jugo gástrico llegan al intestino. En el intestino deben resistir a los ácidos grasos que produce la microbiota del hospedador, la secreción de mucina, la eliminación de células epiteliales y el peristaltismo intestinal (Martínez, 2007).

Una vez superada la primera línea de defensa intestinal, invaden el epitelio, la infección depende de la capacidad de la *Salmonella* de colonizar (adhesión) e ingresar (invasión) a las células intestinales, además de replicarse dentro de la célula hospedadora y resistir a los fagocitos, para así continuar con la difusión en el organismo (Soria, 2011).

Se puede distinguir dos grupos de factores de virulencia, por un lado, las estructuras que se encuentran en la superficie de la bacteria, como son los flagelos, los lipopolisacáridos (LPS), la cápsula y las fimbrias, que además son dianas del sistema inmune del hospedador. Por otro lado, tenemos a los genes de virulencia localizados en el cromosoma o en los plásmidos de la bacteria, estos codifican factores que pueden modificar la fisiología celular del hospedador, además protegen a la bacteria de los antimicrobianos; estos genes pueden estar en pequeñas agrupaciones (islotes) y/o en agrupaciones más grandes llamadas Islas de Patogenicidad (SPI, por sus siglas en inglés) (Schmidt y Hensel, 2004).

Los genes implicados en la fase de la infección intestinal están localizados en las SPI 1 y SPI 2, el primero es un segmento implicado en la invasión de las células no fagocíticas y la penetración inicial de la bacteria, además contiene 31 genes que codifican el Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3); mientras el SPI 2 posee un papel esencial en los estadios siguientes de la infección (Parra *et al.*, 2002; Soria, 2011).

Como parte del mecanismo de invasión, se lleva a cabo la unión a receptores específicos que están situados en la superficie de la célula huésped. La bacteria atraviesa la capa de moco intestinal y se adhiere al epitelio intestinal por adhesinas codificadas por el SST3 (Lamas *et al.*, 2018). Estudios demuestran que la *Salmonella enterica* es capaz de penetrar tanto enterocitos como células M (Martínez, 2007).

Debido a la acción del SPI1-SST3, se inocula en la célula hospedadora una variedad de efectores, los cuales interactúan con los sistemas de señalización celular, forzando el ingreso de la bacteria, como consecuencia se desencadena el proceso inflamatorio en la mucosa. Una vez dentro del citoplasma, se da el proceso de macropinocitosis, donde la *Salmonella* se localiza en el interior de vesículas membranosas denominadas SVC's

(vacuolas que contienen *Salmonella*), y expresa un segundo SST3 codificado por el SPI2, de importancia clave para sobrevivir y replicar dentro de las células huésped (células epiteliales y macrófagos) (Lamas *et al.*, 2018).

La entrada del patógeno provoca la afluencia masiva de polimorfonucleares (PMN) que tratan de fagocitar a las bacterias. La acción del SPI2-SST3 les confiere a las salmonelas la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos (Martínez, 2007).

La interrupción del metabolismo de las células infectadas, trae como consecuencia la producción de citoquinas que atraen PMN's. Estos liberan grandes cantidades de prostaglandinas debido a su acción en el metabolismo del adenilciclasa, generándose un incremento de los niveles de AMPc, consecuentemente se interrumpe la absorción de Na⁺ y el aumento de la secreción de Cl⁻, lo que resulta en una gran pérdida de agua por parte de la célula huésped. El aumento de secreción de líquido hacia la luz intestinal es signo evidente de una diarrea en un paciente afectado (Parra *et al.*, 2002).

Los macrófagos que fueron capaces de reconocer y fagocitar a las bacterias, liberan IL-12 para así dar inicio de la respuesta inmune específica, actuando sobre los linfocitos T tipo Th1, los cuales liberan sustancias, como el interferón y que activan en los macrófagos la capacidad de destruir las bacterias que han sobrevivido en su interior (Raffatellu *et al.*, 2006).

Los casos de las infecciones por *Salmonella* extraintestinales, se relacionan con la inhabilidad de los macrófagos de eliminar a las bacterias que ingresaron por la vía oral, ellas sobreviven y se replican en dentro de las SCV's. La migración de los macrófagos facilita la diseminación en el huésped, primero por vía linfática y luego a través del torrente sanguíneo (Lamas *et al.*, 2018).

2.3.6. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Las Salmonelas son microorganismos muy resistentes ya que pueden adaptarse a las condiciones de temperatura, pH y actividad del agua (aw) más allá de su rango normal, lo que representa un enorme riesgo para la seguridad alimentaria (Cuadro 3) (Doyle *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Condiciones para el crecimiento de *Salmonella*.

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	5,2 (la mayoría de los serotipos no crecen a temperaturas menores de 7°C)	35-43°C	45 – 47°C
pH	3,8	6,5 – 7,5	9,5
Actividad acuosa (aw)	0,94	0,995	Mayor de 0,999

Fuente: Adaptado y modificado de CFSPH, 2005; García, 2011.

Aunque las salmonelas son generalmente consideradas de naturaleza mesofílica, últimos estudios demostraron que algunas cepas de *Salmonella* pueden crecer a temperaturas elevadas de hasta 54°C, y otros pueden crecer en alimentos almacenados entre 2°C y 4°C. Está demostrada su capacidad de proliferar en un pH de entre 3.99 y 9.5, teniendo un pH óptimo de 6.5 a 7.5 La interacción dinámica entre varios factores de crecimiento (como concentración de sal, pH y temperatura) aumentan más las probabilidades de adaptación por parte de la *Salmonella*, aunque generalmente se inhibe en presencia de NaCl 3 a 4%, la tolerancia a la sal puede aumentar con el incremento de la temperatura en el rango de 10 a 30°C (Doyle *et al.*, 2001).

Muchos desinfectantes tienen poder contra la *Salmonella*, como el hipoclorito de sodio al 1% , glutaraldehído al 2%, etanol al 70%, fenólicos desinfectantes a base de yodo y formaldehídos. La muerte celular de la *Salmonella* se da al someterla a calor húmedo (121°C durante no menos de 15 minutos) o calor seco (160 a 170°C durante no menos de 1 hora) (CFSPH, 2005).

2.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EN LABORATORIO

El aislamiento tradicional de *Salmonella* spp. implica un enriquecimiento no selectivo, seguido por un enriquecimiento selectivo, siembra en agares selectivos, para luego realizar la confirmación bioquímica y serológica de las colonias sospechosas (Jamshidi *et al.*, 2009; González *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Durante los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de tipificación molecular en base a la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Talavera *et al.*, 2011).

2.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

El diagnóstico de la *Salmonella* se basa en determinar su presencia o ausencia, tiene más importancia la detección que los recuentos en placas, debido a que estos microorganismos suelen estar en cantidades muy bajas y acompañados por una flora variada, lo cual dificulta su aislamiento (Soria, 2011).

El aislamiento inicia con un pre-enriquecimiento, con el objetivo de normalizar metabólicamente a las salmonelas para su adecuado desarrollo (Pedraza *et al.*, 2014).

La muestra pre-enriquecida se incuba en medios de enriquecimiento selectivo, con la finalidad de inhibir el crecimiento de la flora acompañante, y favorecer el crecimiento de las salmonelas de muestras en las que se encuentran en cantidades muy bajas. La diferenciación de las colonias de *Salmonella* de otras bacterias, se evalúa mediante la observación de los aspectos característicos de sus colonias en los distintos medios selectivos y diferenciales que permiten su crecimiento (Caffer *et al.*, 2008; Soria, 2011). Los medios utilizados en este procedimiento se detallan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de *Salmonella*.

Pre-enriquecimiento	Enriquecimiento selectivo	Medios Selectivos-diferenciales
Caldo Lactosa (CL)	Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV)	Agar Hektoen Enterico (H)
		Agar Sulfito de Bismuto (SBI)
Caldo Triptefina de Soja (TSB)	Caldo peptona de soja Rappaport-Vassiliadis (RVPB)	Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD)
		Agar dexosicolato-citrato
Caldo Nutritivo (CN) Caldo	Caldo Muller-Kauffmann Tetracionato (MKTT)	Harlequin Salmonella ABC
		Agar sacarosa desoxicolato citrato lactosa (DLCS)
Caldo Nutritivo (CN)	Caldo Tetracionato (TT)	Agar Rambach (AR)
		Agar cromogénico SM-ID
	Caldo Selenito-Cistina (SC)	Agar Xilosa lisina tergitol 4 (XLT4)
		Agar Salmonella Shigella (SS)
	Caldo Selenito F (CSF)	Agar sulfito de bismuto (ASBi)

Agua Peptona Bufferada (BPW)	Agar Mac Conkey (MC)	
	Agar semi-solido Rappaport Vassiliadis modificado (MSRV)	Agar Verde brillante cristal violeta lisina manitol (MLSB)
		Agar verde brillante (VB)

Fuente: Soria, 2011.

Las colonias sospechosas de *Salmonella* se identifican con pruebas bioquímicas, con el fin de confirmar la presencia de la bacteria, principalmente la identificación se lleva a cabo en las siguientes pruebas bioquímicas: el agar Triple azúcar hierro (TSI) y el agar Lisina hierro (LIA), Caldo Úrea y Medio sulfuro indol motilidad (SIM) (Pachón, 2009; Zambrano *et al.*, 2013; Pedraza *et al.*, 2014).

La mayoría de las serovariedades aisladas en el hombre y los animales, pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, poseen características bioquímicas semejantes, lo cual contribuye a su identificación (Cuadro 5).

Cuadro 5. Pruebas bioquímicas para *Salmonella enterica* subesp. *enterica*

Pruebas bioquímicas	Resultado
Lactosa	-
ONPG	-
Producción de SH ₂	+
Glucosa (fermentación)	+/-con gas
Dulcita (fermentación)	+
Adonita (fermentación)	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+
Arginina dihidrolasa	+
Úrea (hidrólisis)	-
Indol	-
Motilidad	
Rojo de Metilo	+
Voges Proskauer	-
Citrato de Simmons	+
Malonato	-

Fuente: Caffer *et al.*, 2008.

2.4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Cuando se trata de la epidemiología de la salmonelosis, la identificación molecular de la especie es esencial, muchas veces no se realiza debido a las limitaciones que posee la detección mediante técnicas de cultivo, además del tiempo que se requiere. Con el objetivo de desarrollar una robusta evaluación de la diversidad de especies de *Salmonella* presentes en muestras sospechosas, se utilizan marcadores genéticos específicos, y el PCR fue ideado para ello (Baratto *et al.*, 2012).

Los métodos de tipificación molecular se vienen usando con gran éxito, complementando los métodos fenotípicos (Campioni *et al.*, 2012). La amplificación *in vitro* de ADN por el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico (Malorny *et al.*, 2003).

2.4.2.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de ADN. Desarrollada en 1983 por el Dr. Kary Mullis, quien en 1993 recibe el Premio Nobel de Química como reconocimiento a su descubrimiento (Atawodi *et al.*, 2010).

Considerada como la técnica más importante y revolucionaria en la biología molecular, es sensible y específica. Su importancia radica en la capacidad de obtener un gran número de copias de un fragmento específico de ADN de forma rápida y a bajo costo. Se fundamenta en la capacidad natural que tienen las ADN polimerasas de crear copias idénticas de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas de forma alternada y así lograr la separación de las hebras de ADN recién creadas, y para luego se de la unión con las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas; este procedimiento se lleva a cabo dentro del Termociclador, equipo capaz de cambiar la temperatura (Salazar *et al.*, 2013).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que viene ocupando un papel importante en el campo del diagnóstico en laboratorio, permitiendo la detección de varios patógenos como las salmonelas presentes en diferentes tipos de muestras; logrando la reducción del tiempo requerido y así poder detectar e identificar al agente con alta especificidad y sensibilidad (Abd El Tawwab *et al.*, 2013).

La PCR proporciona una nueva estrategia para la detección de *Salmonella*, la especificidad de la reacción está determinada por la exclusividad de una secuencia diana

de ADN (Das *et al.*, 2012). Una alternativa es la detección del gen *invA* por PCR, ya que es altamente sensible y específica. La precisión que posee la PCR sobre el gen *invA* para la detección de *Salmonella enterica* debe ser confirmado en muestras animales y ambientales (Nucera *et al.*, 2006).

Los siguientes pasos conforman el esquema convencional de una PCR:

- **Desnaturalización**

Etapa en la cual la doble cadena de ADN se desnaturaliza completamente y así poder iniciar la síntesis de su nueva cadena complementaria, permitiendo el pase de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias (Bolívar *et al.*, 2014). Es llevado a cabo a 94-95°C, que es la temperatura más alta que la enzima puede soportar de 30 ciclos a más sin ser dañada, la desnaturalización es llevada a cabo durante 5 minutos para garantizar que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula de ADN (Ehtisham *et al.*, 2016).

- **Alineación**

En esta fase, se genera la energía cinética necesaria para que los primers se unan al extremo 3' de las cadenas complementarias, formándose los puentes de hidrógeno con la cadena molde (Cornejo *et al.*, 2014). Es importante que la temperatura de alineación sea la óptima, generalmente la temperatura se encuentra en un rango de 55 y 60°C (Salazar *et al.*, 2013), si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del PCR será eficiente, ya que se disminuyen las uniones incorrectas de los primers con sitios erróneos del ADN molde (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

- **Extensión**

Consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción de la ADN polimerasa, usando como sustrato los dNTPs (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (Cornejo *et al.*, 2014). La temperatura óptima para la síntesis de ADN puede variar ligeramente según la ADN polimerasa empleada, cuando se usa la Taq polimerasa, la temperatura ideal es de aproximadamente 72°C (Bolívar *et al.*, 2014; Ehtisham *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2013; Tamay de Dios *et al.*, 2013). El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento que se desea amplificar.

2.4.2.2. GEN *invA*

La invasión de células eucariotas es un paso esencial en el ciclo de vida de varios patógenos microbianos, las estrategias para ingresar y sobrevivir han ido evolucionando, la penetración de las células epiteliales de la mucosa intestinal es uno de los primeros pasos en el establecimiento de la infección por una variedad de patógenos entéricos, y el gen *invA* es un gen que codifica una proteína en el interior de la membrana de las bacterias, la cual tiene un papel importante en la invasión a las células epiteliales del huésped (Galán y Curtis III, 1989; Darwin y Miller, 1999 Bhatta *et al.*, 2007).

El gen *invA* se encuentra en la isla de patogenicidad 1 (SPI1) de *Salmonella* spp., que codifica proteínas estructurales del sistema de secreción de tipo 3 (Collazo y Galán, 1997; Malorny *et al.*, 2003). Las SPIs son agrupaciones de genes ubicados dentro del cromosoma bacteriano que tienen la función de codificar componentes importantes para la interacción con el hospedador, demostrando un papel esencial en la virulencia de la *Salmonella*, incluyendo la penetración de enterocitos y la sobrevivencia en macrófagos (Silva y López, 2012).

Al inicio de la infección, la penetración bacteriana en el epitelio intestinal es necesaria, para esta acción los genes requeridos se localizan en la SPI1, esta región cromosomal tiene una gran importancia en las diversas serovariedades de *Salmonella*, ya que determina la presencia y funcionalidad del gen *invA* (Espinal *et al.*, 2006; Silva y López 2012).

El gen *invA* de *Salmonella* posee secuencias únicas para este género y ha demostrado ser un objetivo de PCR adecuado con un gran potencial en su aplicación en el diagnóstico (Rhan *et al.*, 1992; Abd El Tawwab *et al.*, 2013). Amplificación de este gen ahora ha sido reconocido como un estándar internacional para detección del género *Salmonella* (Malorny *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2013). La PCR de *Salmonella* con primers para *invA* es rápida, sensible y específica para la detección de *Salmonella* en muchas muestras clínicas, por lo tanto, es una técnica altamente confiable (Rhan *et al.*, 1992; Salehi *et al.*, 2005).

2.4.3. SEROTIPIFICACIÓN

La serotipificación es un método de tipificación utilizado para diferenciar los aislados de *Salmonella* más allá del nivel de subespecie (CDC, 2011). Es parte de la caracterización epidemiológica de los aislados, ya que faculta la determinación de la

prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas; es pieza importante en los estudios de brotes, ya que permite determinar la fuente de infección y vías de transmisión (Herikstadh *et al.*, 2002).

La serotipificación de las cepas de *Salmonella enterica* involucra la identificación de antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O) y antígenos flagelares (proteínas, antígenos H), el uso de las reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación se basa en que los microorganismos poseen diferentes componentes antigénicos como proteínas, hidratos de carbono, etc.; estos componentes pueden servir como determinante antigénico, por ello se emplea sueros que contienen anticuerpos específicos, que mediante la microaglutinación determinará la cepa de acuerdo a su estructura antigénica.

2.4.3.1. ESQUEMA DE KAUFFMAN WHITE

Los serotipos de *Salmonella* se designan de acuerdo al esquema de Kauffmann-White, publicado por el “Centro colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de Paris, y es utilizado por la mayoría de los laboratorios de salud pública en todo el mundo. Este esquema agrupa todas las serovariedades conocidas de *Salmonella* (CDC, 2011). El esquema de Kauffmann White, es un manual para uso diagnóstico diario, cada serotipo de *Salmonella* es antigénicamente distinguible, reconocido por la posesión particular de antígenos somáticos y flagelares, ya que cada combinación de estos antígenos es única (APHL, 2014).

El formato típico para una fórmula de un serotipo es: Subespecie O antígeno, Vi (de estar presente): antígeno H fase 1: antígeno H fase 2 (si está presente).

El esquema de Kauffmann-White está constituido por un esquema cuádruple de columnas:

- Primera columna

Hace referencia al nombre de la serovariedad, el nombre del serotipo no está en cursiva y la primera letra está en mayúscula, el nombre puede ser abreviado como por ejemplo *Salmonella* serotipo Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium o simplemente serotipo Typhimurium (APHL, 2014).

- Segunda columna:

Antígenos de tipo somáticos (O). Conformado por números que representan uno o más factores propios del antígeno O, los cuales son separados a través de una coma (.). El

esquema de Kauffmann-White contiene 67 grupos O, desde el grupo A hasta el grupo Z, luego continua con números desde O:51 hasta el O:67.

- **Tercera y cuarta columna:**

Antígenos flagelares (H). Indica los factores de las fases 1 y 2 (si está presente) del propio antígeno H. Los factores de la fase 1 se les suele denominar con letras minúsculas, a los de la fase 2 se les denomina con números arábigos y algunos casos se usan letras minúsculas; el símbolo algorítmico “-” se usa cuando hay una ausencia de fase, esto quiere decir que la serovariedad es monofásica.

Ejemplo:

Salmonella Enteritidis 1,9,12:g,m:-

El antígeno O está representado por la numeración **1,9,12**; el Antígeno H (fase 1) representado por: **g, m**; el antígeno H (fase 2) es -; fase 2 está ausente, es por ello que la serovariedad es monofásica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El objetivo general del presente trabajo fue la caracterización de 46 aislados compatibles bioquímicamente con *Salmonella* spp. (mediante bioquímicas convencionales), los cuales fueron obtenidos entre los años 2012 y 2017, y almacenados en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria Sección Bacteriología y Micología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Para ello se realizó la caracterización genética determinando la presencia del gen *invA*, y la caracterización serológica, siendo esta última el objetivo con más significancia por su importancia epidemiológica.

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria Sección Bacteriología y Micología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el mes de agosto y setiembre del año 2018. La serotipificación de los aislados se realizó en el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) en el mes de diciembre del año 2018.

3.3. DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

Se analizó un total de 46 aislados de *Salmonella* spp. de origen aviar, los cuales fueron aislados y almacenados en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de

la Facultad de Medicina Veterinaria Sección Bacteriología y Micología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, entre los años 2012 y 2017. El cepario constituye un registro de todas las muestras positivas por evaluación fenotípica y bioquímica a *Salmonella* spp. sin discriminar su patogenicidad, los cuales son preservados en criotecas a -20°C. Este registro está conformado por muestras provenientes de diferentes fuentes: huevos comerciales (21/46), folículos ováricos (6/46), carcasa de pollos de engorde (3/46), vísceras como bazo (9/46) e hígado (7/46) (ANEXO 2). Como parte del servicio de diagnóstico que ofrece el laboratorio, está el servicio de Bacteriología de los alimentos, mediante el cual de forma frecuente se recibe muestras de esta naturaleza.

3.4. MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

a. Equipos

- Estufa para incubación a 37°C
- Micropipeta (10,100, 200 μ m)
- Termociclador
- Flujo laminar
- Cámara de electroforesis
- Refrigeradora – congeladora
- Centrífuga
- Transiluminador SafeVIEW
- Vortex
- Microcentrífuga

b. Reactivos y Medios de cultivo

- Agar Trypticase de Soja (TSA)
- Agar XLD
- Agar MacConkey
- Gel Agarosa
- Reactivo de Kovacs
- Caldo flagelar
- Solución fisiológica formulada al 1

c. Materiales para identificación genética:

- GeneJET™ Genomic DNA – Purification Kit

- FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack de Roche y primers
- Agarosa y agua molecular

d. Materiales para la serotipificación

- Antisueros somáticos y flagelares específicos, mono y polivalentes (Denka Seiken Co.)

3.5. MATERIAL EXPERIMENTAL

Aislados en estudio

Se evaluaron 46 aislados previamente identificados por sus características morfológicas y metabólicas, como *Salmonella* spp; las cuales provenían de muestras de origen aviar. Las unidades muestrales fueron conservadas en caldo cerebro corazón (BHI) con glicerol al 20% en tubos de 2 ml a una temperatura de -20 °C.

Cepas de referencia

Como cepa de referencia positiva se empleó a la *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Además, se usó como cepa de control negativo a *Escherichia coli* ATCC 8739. Las cepas referenciales fueron conservadas en caldo cerebro corazón (BHI) más glicerol al 20%, dentro de tubos de 2 ml y a una temperatura de -20°C.

3.6. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.6.1. REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS

Los 46 aislados de *Salmonella* spp. y las 2 cepas de referencia, fueron reactivados empleando un protocolo modificado al de Sánchez y Corrales (2005). Se retiró los viales del ambiente de -20°C, y se esperó su descongelación para luego proceder con la recuperación de los microorganismos. Se eligió como medio de cultivo líquido para la reactivación al caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB), que estuvo conservado a 2°C en tubos de ensayo de 12mm x 10 mm en un volumen de 3 ml. Se inoculó 10ul de las cepas en el TSB, y fueron colocados a 37°C por 18 horas, para luego ser sembrados por agotamiento con la ayuda de un ansa de siembra en medios selectivos: Agar MacConkey (MC) y en Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD), se procedió a la incubación a 37°C por 24 horas. Se sembró en agar MacConkey ya que permite detectar con rapidez bacterias gran negativas no fermentadoras de lactosa como *Salmonella* spp., las colonias

sospechosas no presentan ninguna coloración. Así mismo, se sembró en agar XLD para poder observar el crecimiento característico de *Salmonella* en este medio: colonias circulares transparentes con tonos rojizos y centro negro debido a la liberación de sulfuro de hidrógeno (H₂S).

Posteriormente se inocularon las colonias de *Salmonella* en tubos de microcentrífuga estériles de 2 ml conteniendo 1500 µL de TSB, y fueron llevados a incubar a 37°C por 3 horas.

3.6.2. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Se procedió a realizar la extracción del ADN genómico de los aislados en estudio y las cepas de referencia, empleando el kit comercial Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification (ThermoFisher Scientific). Para ello se siguieron las especificaciones recomendadas en el protocolo indicado por la firma comercial para la extracción de ADN genómico de bacterias gram negativas (Anexo 1). El material genético extraído fue colocado en tubos de microcentrífuga estériles de una capacidad de 1.5 ml y fueron inmediatamente almacenados a -20°C.

3.6.3. PCR

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el ADN extraído, se emplearon los cebadores descritos en el cuadro 6, que codifican una secuencia específica del gen de invasividad *InvA* de *Salmonella* spp., obteniendo un producto de 244pb. El empleo de cebadores y las reacciones de PCR se realizaron bajo las condiciones que recomienda Bhatta et al., (2007) con algunas modificaciones.

Cuadro 6. Cebadores usados en el PCR.

Genes	Secuencia de nucleótidos (5'a 3')	Tamaño de Producto (pb)
<i>invA</i>	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244
	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	

Fuente: Bhatta *et al.* (2007)

El volumen final de muestra fue ajustado a 20 µL, el cual contenía 10 µL de mezcla HotStarTaq® Master Mix 2X (QIAGEN Group, Alemania), 1 µL de Primer *invA1*, 1 µL de Primer *invA2*, 6 µL de un agua libre de nucleasas (H₂O up) y, por último, 2 µL de ADN previamente extraído. Para la reacción de amplificación, se empleó un termociclador Biometra TOne (Analytik Jena, Jena, 07745, Alemania) bajo las siguientes condiciones: Incubación inicial a 94°C por 1 minuto, luego 30 ciclos con una desnaturalización de 30 segundos a 94°C, hibridación de 30 segundos a 60°C, extensión de 2 minutos a 72°C y una extensión final por 10 minutos a 72°C.

Para el análisis de los amplicones, se empleó un método de electroforesis en gel de agarosa al 2% más buffer TBE 0.5X durante 75 minutos a 100V, todo ello es una cámara horizontal de electroforesis. Los productos fueron analizados en el transiluminador SafeVIEW de luz azul. Para la determinación del tamaño se emplearon marcadores de peso molecular de 100pb Opti- ADN Marker (Applied Biological Materials ABM®), los cuales fueron colocados en el primer y último carril. Como reactivo fluorescente para la visualización instantánea de las bandas de ADN se usó el colorante Safe-Green™ (Applied Biological Materials ABM®).

3.6.4. SEROTIPIFICACIÓN

Luego de que los aislados fueron identificados como cepas patógenas de *Salmonella* spp., se procedió a establecer sus serovariedades, mediante el empleo de kits serológicos comerciales. Los aislados fueron expuestos a antisueros somáticos y flagelares específicos, mono y polivalentes de la marca Denka Seiken. El kit está compuesto por 7 sets que contienen anticuerpos somáticos y flagelares específicos. Se siguieron las recomendaciones indicadas por Caffer *et al.*, (2008) y se tuvo en cuenta las consideraciones sugeridas por el fabricante.

3.6.4.1. Serotipificación somática

La determinación del antígeno O proveniente de *Salmonella* spp. se realizó en lámina portaobjetos, para ello se utilizaron cultivos en medio agar tripticasa de soya (TSA) de 24 horas a 37°C. Acto seguido, se verificó que los aislados estén en forma lisa, se enfrentó una ansada del cultivo con una gota de solución salina al 2%, luego de rotar suavemente

por 30 segundos se observa la presencia o ausencia de grumos. La evaluación fue la siguiente: si se observan grumos, la cepa está rugosa y se debe recuperar la forma lisa mediante subcultivos de la cepa en agar Mueller Hinton; si no se observan grumos se prosigue con la serotipificación somática O.

Posteriormente se realizó lo siguiente:

- En la superficie de una lámina portaobjetos se enfrentó una cantidad pequeña del cultivo con una gota de antisueros Polivalentes O y O1, mezclándolo suavemente con un ansa estéril. Esto debido a que los antisueros facilitan una primera selección en grandes grupos.
- Seguidamente, se procedió a mover la lámina durante 2 minutos, suavemente; luego se observó con luz indirecta la presencia o ausencia de aglutinación.
- Al observarse aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes, se probaron con los antisueros del grupo O correspondiente.
- Luego de ver aglutinación con un antisuero de grupo O se probaron con los antisueros de factores O.

Si la muestra no aglutina con los sueros polivalentes, puede tratarse de una serovariedad no comprendida en dichos antisueros, si es el caso se debe remitir la cepa a un Laboratorio de referencia. O puede tratarse de una serovariedad que presente el antígeno de envoltura Vi como son; *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y algunas cepas de *S. Dublin*; en este caso se debe enfrentar el cultivo con el antisuero Vi.

3.6.4.2. Serotipificación flagelar

El procedimiento fue el siguiente:

- Se sembró una pequeña cantidad de cultivo en 5 ml de caldo flagelar, y se incubó a 37°C durante 18 horas.
- Se pasó una alícuota de 0.5ml del caldo flagelar con cultivo a un tubo de 13x100, estéril y de tapa rosca.
- A la fracción restante de caldo flagelar, se le agregó un volumen de 5ml de una mezcla de solución fisiológica más formol al 1% (caldo formolado) y, seguidamente, se lo dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Seguidamente, se procedió a depositar una gota de cada uno de los antisueros flagelares polivalentes en cuatro tubos de ensayo distintos, para luego adicionarle a cada tubo un volumen de 0.5 ml de caldo formolado que estaba en reposo.

- Se puso a incubación a 50°C en baño maría por una hora, luego se observó con luz indirecta la presencia o no de flóculos.
- Al observar la aglutinación con alguno de los sueros polivalentes, se enfrentó 0.5ml de caldo formolado con una gota de antisueros de fase H correspondientes.
- En los casos en los que el antisuero flagelar estuvo compuesto por más de un factor, se determinaron los correspondientes factores H, usando antisueros específicos para cada factor.

En caso de que la cepa de *Salmonella* spp. evaluada no reaccione con ningún antisuero flagelar polivalente, cabe la posibilidad de que el aislado presente un antígeno no incluido en la batería de antisueros polivalentes empleados; y, de ser el caso se remite a un Laboratorio de Referencia. Además, podría tratarse de una cepa con motilidad reducida o inmóvil (por la carencia de flagelos); en este caso se debe promover la movilidad a través de pasajes sucesivos en tubos Craigie, los cuales fueron preparados de la siguiente forma: en un tubo de 10x 160mm con tapa rosca se adiciona una varilla hueca de vidrio de 8 cm de largo, depositando 5 ml de agar movilidad a una concentración de 0.5% y, finalmente, se esterilizó por 15 minutos a 121°C. La cepa se siembra en la varilla interior hasta la mitad, se coloca a incubación a 37°C por 24 horas, y luego se puede observar el crecimiento de la cepa a lo largo de la varilla y en el tubo exterior. Seguidamente, con la ayuda de un ansa se procede a tomar una porción del crecimiento bacteriano del tubo exterior para realizar una siembra en el caldo flagelar; desde el cual se realizó la nueva serotipificación flagelar.

En el caso se desarrolle la aglutinación en la muestra con un solo antisuero polivalente flagelar, existe la posibilidad de que se trate de una serovariedad monofásica, o de que se trate de una serovariedad difásica que únicamente expresa una sola fase H, por lo que se empleó el “Método de inversión de Fase” para poner en evidencia la fase no detectada.

3.6.4.3. Método de inversión de fases

En algunas muestras se tuvo que realizar el método de inversión de fases, el cual deja en evidencia la fase que no se expresó, inhibiendo la fase flagelar expresada y permitiendo la expresión de la otra fase. Se realiza de la siguiente manera:

- Se inició depositando dos gotas del antisuero de la fase flagelar expresada con 10 ml de agar movilidad al 0.7% (previamente fundido) en una placa Petri, se homogenizó mediante movimientos rotatorios y luego se dejó reposar.

- Seguido, se procedió al sembrado colocando una ansada de cultivo sin formular en la porción central de la superficie del agar, luego fue puesto a incubación a 37°C durante 24 horas.
- Finalmente, se tomó una muestra de las bacterias que desarrollaron en la periferia de la placa, para luego ser enfrentadas con un antisuero de la fase sospechada.

3.6.4.4. Determinación de los serotipos de las cepas aisladas

Luego de combinar e identificar los antígenos O y H, se prosiguió con la determinación de la serovariedad de acuerdo a lo descrito en el Esquema de Kauffmann-White (Caffer *et al.*, 2008).

IV. RESULTADOS

El objetivo del presente estudio fue detectar cepas patógenas de *Salmonella* spp. en aislados de origen aviar, a través de su identificación molecular y serológica.

a) Detección del gen *invA* mediante PCR

El ADN fue extraído de todos los aislados (46/46) de *Salmonella* spp. en estudio y de las cepas referenciales empleadas como controles positivos y negativos, para su análisis mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los 46 aislados (100%) fueron positivos para la detección del gen *invA*, este resultado nos permitió caracterizar los aislados como *Salmonella enterica*. Los amplicones obtenidos de los aislados en estudio (carril 1 al 11) concuerdan con el amplicon de la cepa de referencial empleada como control positivo: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (carril P). (Figura 4).

La evaluación genética de los aislados nos permitió identificar cepas patógenas, las cuales fueron incluidas en la posterior serotipificación.



Figura 4. PCR para la detección del gen *invA*. Carriles: M: marcador de peso molecular de 100pb, B: Control blanco, P: Control positivo cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, N: Control negativo cepa *E. coli* ATCC 8739, 1-11: Cepas en estudio presentan bandas de 244pb.

b) Serotipificación

Se establecieron las serovariedades de los aislados usando ensayos de aglutinación para antígenos somáticos y flagelares, ello a través de la exposición a antisueros específicos. Según el esquema de Kauffman-White, se obtuvo 5 diferentes fórmulas antigénicas (Cuadro 7), 34.78% (16/46) pertenecientes al serotipo Infantis, 34.78% (16/46) pertenecientes al serotipo Pullorum, 15.22% (7/46) pertenecientes al serotipo Gallinarum, 8.70% (4/46) pertenecientes al serotipo Enteritidis, y 6.52% (3/46) pertenecientes al serotipo Typhimurium (Cuadro 8).

Cuadro 7. Formulas antigénicas obtenidas según el esquema de Kauffman – White.

Grupo	Serotipo identificado	Antígeno	Antígeno Flagelar H	
			Fase 1	Fase 2
C	<i>S. Infantis</i>	6,7, <u>14</u>	r	1, 5
D	<i>S. Pullorum</i>	1, 9, 12	No móvil	No móvil
D	<i>S. Gallinarum</i>	1, 9, 12	No móvil	No móvil
D	<i>S. Enteritidis</i>	1,9,12	g, m	--
B	<i>S. Typhimurium</i>	1, 4, [5], 12	i	1,2

Cuadro 8. Serotipos de *Salmonella* de origen aviar identificados según el esquema de Kauffman-White.

Serotipos identificados	Cantidad	
	(n)	(%)
<i>Salmonella</i> Infantis	16	34.8
<i>Salmonella</i> Pullorum	16	34.8
<i>Salmonella</i> Gallinarum	7	15.2
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	8.7
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3	6.5
Total	46	100%

V. DISCUSIÓN

Salmonella spp. es considerada como el principal agente de enfermedades transmitidas por alimentos, en particular la especie *enterica*. Estas bacterias poseen una compleja interacción con el huésped, la cual implica diversos factores de virulencia que tienen la capacidad de superar las defensas del hospedero. El presente estudio tuvo como objetivo detectar serológicamente y molecularmente *Salmonella* spp. en aislados de origen aviar. Para ello, se desarrollaron ensayos de PCR para detectar la secuencia de un gen de interés, seguido de una serotipificación de las muestras positivas. Si bien el estudio posee un diseño no probabilístico, es una buena base para entender que serovares están presentes en nuestro medio.

El empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* o PCR) en el diagnóstico de enfermedades infecciosas ha permitido una mejora en la capacidad de diagnóstico temprano, lo cual favorece el desarrollo de un tratamiento adecuado (Menon *et al.*, 1999). Debido a la importancia sanitaria de *Salmonella* spp., se han venido desarrollando múltiples tipos de PCR orientados a la identificación de secuencias de genes propios de cepas de *Salmonella* (Malorny *et al.*, 2003)

Las salmonelas zoonóticas tienen una indiscutible capacidad patogénica en humanos, tienen gran importancia en las actividades mercantiles internacionales; especialmente en el comercio de derivados cárnicos o subproductos (carnes, huevos y harinas) destinados al consumo directo humano o animal (Terzolo, 2009). Debido a la importancia de la *Salmonella enterica* en el mundo, es necesario el empleo de técnicas de diagnóstico sensibles, específicas y prácticas que permitan la detección de *Salmonella* a partir de muestras de diverso origen. En ese sentido, Myint *et al.* (2006) indican que la amplificación *in vitro* de ADN por PCR faculta una rápida, sensible y específica

identificación de microorganismos del género *Salmonella*. Considerando la importancia del tema y la necesidad del diagnóstico eficaz de esta bacteria en alimentos contaminados, en el presente estudio empleó y valoró la prueba PCR para la detección de una secuencia del gen *invA*, gen diana para la detección de *Salmonella enterica* obtenidos de aislados muestrales de origen aviar.

Diversos estudios han demostrado la capacidad del gen *invA* en *Salmonella* para su identificación en productos alimenticios, muestras fecales o muestras clínicas por PCR (Nucera *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2012). En base a ello, en la presente investigación se procedió a la selección de un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de 244 pb del gen *invA* según lo descrito por Bhatta *et al.* (2007).

En el presente estudio, el análisis molecular de los aislados de *Salmonella* spp. obtenidos de muestras de origen aviar permitió identificar una secuencia del gen *invA* en todas las muestras procesadas (46/46, 100%). Este hallazgo fue consistente a lo descrito por múltiples estudios en muestras de alimentos de procedencia animal (Das *et al.*, 2012) incluyendo los de origen aviar (Borges *et al.*, 2013; Fardsanei *et al.*, 2017) y de muestras clínicas colectadas de animales y humanos (De Oliveira *et al.*, 2003; Luigi *et al.*, 2015). De manera similar, Rahn *et al.* (1992), Malorny *et al.* (2003), Espinal *et al.* (2006) y Turki *et al.* (2014) reportaron frecuencias relativamente altas del gen *invA* en aislados de *Salmonella* spp. de 99.4%, 99.6%, 97.3% y 93.8% respectivamente. Esta ligera diferencia en las frecuencias en referencia al presente estudio pudo deberse a una pérdida o delección de la isla de patogenicidad SPI1, lo cual podría afectar la detección del gen debido a una alteración en el sitio de inserción en el cromosoma y/o remoción de los genes contenidos en la isla, probablemente por la transferencia horizontal de dichos bloques de genes de virulencia (Espinal *et al.*, 2006).

Es probable que la alta tasa (100%) de detección reportada en el presente estudio sea debido a que el gen *invA* representa a un gen de invasión altamente conservado entre los serotipos patógenos de *Salmonella enterica* (De Oliveira *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2012). Además, las muestras trabajadas, como parte del proceso de su reactivación fueron sembradas en medios selectivos (Agar MacConkey y XLD) para así separar del estudio muestras contaminadas y/o no viables, asegurando así la pureza del ADN extraído.

Como parte del protocolo de cultivo y aislamiento de muestras sospechosas del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria Sección Bacteriología y Micología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se realiza un pre enriquecimiento y enriquecimiento selectivo, ya que las

bacterias que presenta la muestra generalmente tiene una reducción de viabilidad debido a la exposición prolongada a condiciones desfavorables, el enriquecimiento de las muestras tiene la ventaja de mejorar la sensibilidad del ensayo (Myint *et al.*, 2006). El protocolo de PCR de nuestro estudio incluye un Hotstart, el cual es sugerido como una solución para reducir la amplificación de productos no específicos y así aumentar la eficiencia del PCR (Sachse, 2003).

La amplia gama de serotipos identificados en muchos países reflejan el desafío de la salmonelosis a la salud pública y su control. La serotipificación es un procedimiento que ahora se usa ampliamente, esto permite la detección rápida de grupos y brotes, además de la rápida comunicación de los resultados. Investigar los brotes proporciona información crítica sobre cómo controlarlos, y cómo prevenir eventos similares en el futuro, ya que los brotes son generalmente causados por la contaminación de algún alimento por un solo serotipo; los alimentos más involucrados son los alimentos de origen aviar. La serotipificación es el punto de partida esencial para las investigaciones epidemiológicas sobre la fuente de infecciones, y es necesaria para monitorizar la efectividad de las medidas de control. Por lo tanto, la serotipificación representa un componente crítico de una respuesta nacional de salud pública a la salmonelosis (Herikstadh *et al.*, 2002).

La serotipificación es considerada parte de la estrategia de vigilancia en laboratorio, que incluye el monitoreo de la resistencia antimicrobiana. Brotes de gran importancia han sido reconocidos e investigados con éxito, por ejemplo, en la década de 1970, se notificó por primera vez una diseminación global de *Salmonella* Agona en harina de pescado de procedencia peruana; harina que era exportada y destinada a la alimentación de aves para consumo humano. Sumado a esto, la identificación de infecciones gastrointestinales en varios países producidas por el serotipo Agona, sirvió para demostrar que la harina de pescado constituye una fuente importante de infección por *Salmonella*, teniendo como intermediario a las aves de corral, ya que parte de su alimentación está constituida por la harina de pescado (Grados, 1974).

A nivel serológico, en el presente estudio se identificaron los serotipos Infantis (16/46, 34.8%), Pullorum (16/46, 34.8%), Gallinarum (7/46, 15.2%), Enteritidis (4/46, 8.7%), y Typhimurium (3/46, 6.5%). De los cuales, 3 serotipos representan un riesgo en salud pública (23/46, 50%) (*S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*), debido a que son agentes con potencial zoonótico causales de la salmonelosis no tifoidea en el hombre. Los serotipos restantes (23/46, 50%) *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* son microorganismos responsables de ocasionar la pullorosis y tífosis aviar, respectivamente, en diversas especies de aves domésticas (Terzolo, 2009).

Estudios en diferentes países demostraron que *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis* son los serovares más habitualmente encontrados en muestras de aves reproductoras y pollos de engorde, las cuales son causantes de alta morbilidad y mortalidad en humanos (Suárez y Mantilla, 2000; Medeiros *et al.*, 2011). Del total (46) de serotipos identificados en el presente estudio, el 50% (23/46) de ellos tiene una importancia en la salud pública; de los cuales, un 69.3% (16/23) está representado por el serovar *Infantis*. Este hallazgo es similar a los descritos por Hengl *et al.*, (2016) en Croacia, que indica que *S. Infantis* se encuentra en frecuencias (88.2%) que llegan a superar el 50% en muestras de carcasas de pollos de engorde.

S. Enteritidis y *Typhimurium* son los serovares predominantes en infecciones por *Salmonella* no tifoidea en humanos; sin embargo, en los últimos años *S. Infantis* se ha convertido en un serotipo emergente entre los causantes de salmonelosis no tifoidea, siendo una importante preocupación debido a su frecuente aislamiento en humanos el cual puede estar correlacionada a la elevada frecuencia de este serovar en aves de corral, además su resistencia a múltiples fármacos parece ser propagada exitosamente entre productos de origen aviar y humanos a través de la cadena alimentaria (EFSA- ECDC, 2015b; EFSA-ECDC, 2018; Pate *et al.*, 2019). Se ha demostrado que las cepas emergentes de *S. Infantis* se caracterizan por mutaciones cromosómicas adaptativas y un megaplásmido, este le confiere resistencia a múltiples antimicrobianos, metales pesados y desinfectantes, además mejora sus fenotipos asociados a la virulencia y a su patogenicidad. Debido a esto tienen una ventaja significativa tanto en el medio ambiente como en el hospedero, por lo tanto su difusión es más eficiente y rápida (Aviv *et al.*, 2014).

En Perú, se han reportado datos que demuestran que *S. Infantis* es el serotipo más frecuente en granjas avícolas (91.43%) (Valderrama *et al.*, 2014), estudios previos indicaron que en el 2011 era el tercer más frecuente en aislados de muestras clínicas de humanos y de alimentos (Zamudio *et al.*, 2011). Esto podría estar relacionado con el incremento actual, tal como lo reporta Quino *et al.*, (2019), el cual indica que el 65% (193/297) de muestras clínicas de humanos remitidas de diversas regiones del Perú, fueron confirmadas como *Salmonella Infantis*. Estos hallazgos sugieren que es el serovar actualmente predominante epidemiológicamente en Perú. Por lo tanto, se requieren de mayores estudios para evaluar la dinámica de este serovar, considerando que se concluye que es el serovar más prevalente en humanos a partir de un estudio realizado en el 2019, y en relación a las aves como potencial fuente se cuenta con una referencia del 2014.

Los huevos continúan estando implicados como fuente potencial o vehículo para salmonelosis humana, estos pueden contaminarse internamente dentro del sistema reproductivo de la gallina por infección transovárica, durante el desarrollo del óvulo antes de la formación de la cáscara. La contaminación externa puede ocurrir durante o después de la ovoposición, a través del paso por el oviducto infectado con *Salmonella* o a través del contacto con heces de pollo contaminadas en la cloaca, así como por contacto con superficie contaminadas en el gallinero (Okamura *et al.*, 2001; De Reu *et al.*, 2006). Los huevos también pueden contaminarse durante el proceso de transporte y en los establecimientos de venta, debido a una inadecuado almacenamiento y manipulación (Kaiser y Lamont, 2001). Este papel importante es evidenciado por los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el cuál se encontró que el 76.2% (16/21) de muestras procesadas provenientes de huevos fueron positivos a serotipos con importancia en la salud pública como *Infantis* (52.4%, 11/21), *Enteritidis* (19%, 4/21) y *Typhimurium* (4.8%, 1/21). Esto puede deberse a la habilidad que tienen los diferentes serovares por ocasionar una contaminación en cáscara y/o en el contenido del huevo.

Arnold *et al.*, (2012) determinaron que *S. Enteritidis* provocó una mayor tasa de contaminación en contenido del huevo y una mayor capacidad de colonización de órganos reproductivos. Por otro lado, Lublin *et al.*, (2015) evaluó la capacidad de *S. Infantis* por sobrevivir tanto en el exterior e interior de los huevos de mesa, además reporta la facultad de multiplicarse dentro del huevo a temperatura de ambiente, este reporte respalda la necesidad de la pronta refrigeración para evitar la multiplicación de *Salmonella* durante el almacenamiento de los huevos a temperatura de ambiente.

La gran mayoría de huevos destinados al consumo humano son lavados antes del empaque para eliminar la suciedad y el material fecal, para así reducir la contaminación microbiana de la cáscara del huevo. Según lo descrito por Samiullah *et al.* (2013), el lavado puede ser eficaz para eliminar *S. Infantis* de la superficie de la cáscara del huevo, sin embargo, el lavado puede permitir la posterior infiltración de *Salmonella* gracias a su capacidad de atravesar la cáscara y membranas del huevo, esto debido a una recontaminación del huevo después del lavado.

El aislamiento de *Salmonella* en distintos órganos sugiere un carácter septicémico. Se ha demostrado que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, en gallinas, cuentan con la capacidad de colonizar tejidos que conforman su aparato reproductor (Terzolo, 2009), al igual que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Revolledo y Piantino, 2009).

La falta de vigilancia en los sistemas de producción de otras especies de aves de corral pueden representar un peligro para la salud de otras lotes sanos, ya que las aves enfermas pueden ser reservorios de patógenos como es el caso de la *Salmonella*. La salmonelosis no zoonótica (Tifosis y Pullorosis) puede conducir a una considerable pérdida en la economía asociada con alta mortalidad y reducción de la puesta de huevos (Casagrande *et al.*, 2014).

Se pudo determinar que *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* fueron los serotipos más frecuentes en muestras de vísceras (N=22) provenientes de codornices, obteniéndose un 63.6% y 18.2% respectivamente. Esto puede deberse a que los serotipos Pullorum y Gallinarum causan una infección sistémica, los cuales pueden persistir en el sistema reproductor y en el bazo de las aves durante más de 40 semanas, incluso después de la infección puede expandirse más llegando a otros órganos (Rocha-e-Silva *et al.*, 2016). Pues según lo descrito por Casagrande *et al.* (2014), ambos serotipos pueden presentarse sin manifestaciones clínicas pero con una mortalidad continua en días o semanas.

El 100% de las muestras de carcasas de pollos evaluadas resultaron positivas a *S. Infantis*. Debido a que las muestras de carcasas de pollos fueron un número reducido, coincidiendo que el total fueron *S. Infantis*, estos resultados podrían estar relacionados a la alta frecuencia en carcasas de pollos de engorde. Sin embargo, este hallazgo es similar a lo explicado por Hengl *et al.* (2016), quienes reportaron que el serotipo de *Salmonella* spp. provenientes de carcasa de pollos de engorde fue *S. Infantis*, con una frecuencia de 88.2%.

Se considera que todas las carcasas de aves pueden estar infectadas, puesto que la cantidad de bacterias inicialmente pudo ser baja y luego ser alta, ya que las canales de aves se contaminan en el proceso de eviscerado y desplumado, o como consecuencia de incorrectas/ausentes medidas de higiene implementadas por el personal que laboran en centros de beneficios (Zambrano *et al.*, 2013).

Finalmente, en el presente estudio se presentó limitantes en relación a que no es un estudio probabilístico y al número de muestras evaluadas, por lo que no representan estadísticamente a la región Lima. A pesar de ello, el hallazgo de 50% de muestras positivas a serotipos de *Salmonella* con carácter zoonótico sigue siendo una advertencia. Estos resultados podrían sugerir la circulación de un serovar emergente y de impacto en la salud pública como es *S. Infantis*.

Es necesario considerar programas de control para garantizar la inocuidad de los alimentos en todos los procesos involucrados a lo largo toda de la cadena productiva

avícola. Se sugiere que el análisis molecular debe llevarse a cabo para lograr un diagnóstico rápido y eficaz, permitiendo un adecuado control y tratamiento de la salmonelosis, al igual que la identificación de los serotipos, el cual es un procedimiento clave e importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que es la base para la vigilancia de una enfermedad zoonótica.

VI. CONCLUSIONES

- Los serotipos hallados en el presente estudio fueron: *S. Infantis* y *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aislados de *Salmonella* de origen aviar del cepario en estudio.
- El 100% de los aislados identificados como *Salmonella* spp. por bioquímica convencional codifican el gen *invA*.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abd El Tawwab AA, Ammar AM, Ali AR, El Hofy FI, SAyed MEE. 2013.** Detection of common (*invA*) gene in *Salmonellae* isolated from pultry using polymerase chain reaction technique. *BVMJ* 25(2): 70-77.
2. **Adelantado C, Arosema EL, Calvo MA, Manteca L, Martín M, Ordoñez G, Ponsa F, Pontes M, Zekaria D. 2008.** *La Salmonella*, de actualidad desde siempre. Barcelona: Real Escuela de Avicultura. 240p
3. **Allen DG, Constable PD, Dart A, Davies PR, Quesenberry KE, Reeves PT, Sharma JM. 2016.** The Merck Veterinary manual. 11ª ed. USA: Merck & CO.
4. **Álvarez FL, Copes J, Álvarez M, Nuñez L, Suzuki K, Goretti M, Zarate N, Castro L, Weiler N, Faccioli ML, Leotta G. 2012.** Frecuencia de *Salmonella* enterica en aves de traspatio de la localidad de San Lorenzo, departamento central, República de Paraguay. *Compend Cienc Vet* 2 (1): 9-11.
5. **[APHL] Association of Public Health Laboratories. 2014.** *Salmonella* serotyping in US Public health laboratories. Georgia: APHL. White paper. 9p.
6. **Arnold ME, Martelli F, McLaren I, Davies RH. 2012.** Estimation of the rate of egg contamination from *Salmonella*-infected chickens. *Zoonoses Public Health* 61 (1): 18-27. doi: 10.1111/zph.12038
7. **Atawodi SE, Atawodi JC, Dzikwi AA. 2010.** Polymerase chain reaction: Theory, practica and application: a review. *Sahel Med J* 13 (2): 54-63. doi: 10.4314/smj2.v13i2.6483
8. **Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, Grassl GA, Gal-Mor O. 2014.** A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity o fan emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Env Microbiol* 16(4): 977 – 994. doi: 10.1111/1462-2920.12351
9. **Baratto CM, Gelinski J, Bernardi AZ, Marafon A, Braun F. 2012.** Potencial use of molecular-typing methods for the identification and characterization of *Salmonella* enterica serotypes isolated in the poultry production chain. *Braz J Poult sci* 14(3): 159 – 232. doi: 10.1590/S1516-635X2012000300003

10. **Betancor L, Yim L. 2012.** *Salmonella* y salmonelosis. Uruguay: Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 11p.
11. **Bhatta DR, Bangtrakulnonth A, Tishyadhigama P, Saroj SD, Bandekar JR, Hendriksen RS, Kapadnis BP. 2007.** Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. Letters in applied microb44 (6): 588-594. doi: :10.1111/j.1472-765X.2007. 02133.x
12. **Bolívar AM, Rojas A, García P. 2014.** PCR y PCR- Multiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed* 3(1): 25-33.
13. **Borges KA, Furian TQ, Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. 2013.** Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from chicken in South of Brazil. *Pesq Vet Bras* 33(12): 1416-1422. doi: 10.1590/S0100-736X2013001200004.
14. **Borgoñ**
15. **o N. 2019.** Reporte de Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el Perú, 2019. *Boletín Epidemiológico del Perú* 28(15): 381-383.
16. **Brands D. 2006.** *Salmonella*: Deadly diseases and epidemics. 1ª ed. Philadelphia: Chelsea house publishers. 102p.
17. **Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA, Mietzner TA. 2011.** Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología Médica*. 25ª ed. México: Ed McGraw. 815p.
18. **Buzby JC, Roberts T. 2009.** The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology* 136: 1851-1862. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.074
19. **Caffer M, Terragno R. 2001.** Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas. 37p.
20. **Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. 2008.** Manual de procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. WHO global Salm Surv para América del Sur.
21. **Calnek BW, Lemus A, Martínez AF. 2000.** Enfermedades de las aves. 2ª ed. México: Editorial El manual Moderno. 1110p.
22. **Campioni F, Moratto AM, Falcao JP. 2012.** Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology* 32(1): 254-264. Doi: 10.1016/j.fm.2012.06.008
23. **Casagrande RA, Barth AT, Wouters F, Pissetti C, De Itapema MR, Driemeier D. 2014.** Fowl typhoid (*Salmonella* Gallinarum) outbreak in japanese quail (*Coturnix coturnix japónica*). *Avian Diseases* 58(1): 491-494. doi: 10.1637/10796-021114-Case.1
24. **Castañeda R, Pulido AP, Mendoza MF, Carrascal A, Sandoval K. 2015.** Detección e identificación de *Salmonella* spp. en huevos para consumo humano, provenientes de diferentes localidades de Bogotá, Colombia, 2015. *Infectio* 21 (3): 154-159.
25. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2015.** National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* annual report, 2015. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service. 29p.
26. **[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2018.** Foodborne Germs and Illnesses. [Internet], [12 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>

27. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2011.** National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service. 12p.
28. **[CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2005.** Animal disease factsheets. Salmonellosis. Iowa State University, Ames, IA, USA. 8p.
29. **[CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2019.** Fowl typhoid and Pullorum disease. Iowa State University, Ames, IA, USA. 6p.
30. **Collazo CM, Galán JE. 1997.** The invasión – associated type-III protein secretion system in *Salmonella* - a review. *Gene* 192 (1):51-59. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00825-6.
31. **Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG. 2014.** Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. 1ª ed. México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático. 256p.
32. **Darwin KH, Miller VL. 1999.** Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12(3): 405-428.
33. **Das A, Sree S, Shalini U, Ganeshkumar A, Karthikeyan M. 2012.** Molecular screening of virulence genes from *Salmonella enterica* isolated from commercial food stuffs. *Biosci Biotech Res Asia* 9(1): 363-369. doi: 10.13005/bbra/1009.
34. **De Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Wageck C, Brandelli A. 2003.** Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different source. *Braz J Microbiol* 34(1): 123-124. doi: 10.1590/S1517-83822003000500042
35. **De Reu K, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J & Herman L. 2006.** Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria including *Salmonella* Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 112: 253-260. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.011.
36. **Dewey D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. 2018.** Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ* 67(10): 1-11. doi: 10.15585/mmwr.ss6710a1
37. **Dinev I. 2010.** Enfermedades de las Aves. 2da ed. Perú: Ceva. 210p
38. **Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. 2001.** Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y fronteras. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia. 816p.
39. **Doyle MP, Beuchat LR. 2007.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3º ed. Washington: ASM Press. 1038p.
40. **Doyle MP, Buchanan RL. 2013.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4ª ed. Washington: ASM Press. 1118p.
41. **[EFSA][ECDC] European Food Safety Authority, European centre for Disease Prevention and Control. 2015a.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13(1): 162p. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991
42. **[EFSA][ECDC] European Food Safety Authority, European centre for Disease Prevention and Control. 2015b.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13(12): 190p. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329
43. **[EFSA][ECDC] European Food Safety Authority, European centre for Disease Prevention and Control. 2018.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12): 262p. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500

44. **Ehtisham M, Wani F, Wani I, Kaur P, Nissar S. 2016.** Polymerase chain reaction (PCR): back to basics. *Indian J Comtemp Dent* 4(2): 30-35. doi: 10.5958/2320-5962.2016.00030.9
45. **Espinal P, Prieto E, Otero V, Máttar S. 2006.** Presencia del gen de invasividad *invA* en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cubana Salud Pública*: 115-120.
46. **Fardsanei F, Soltan MM, Douraghi M, Zahraei T, Mahmoodi M, Memmariansi H, Nikkhahi F. 2017.** Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis* 107: 451-456. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.026
47. **Flint JA, Van Duynhoven YT, Angulo FJ, DeLong SM, Braun P, Kirk M, et al. 2005.** Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: a international review. *Clin Infect Dis* 41: 698-704. doi: 10.1086/432064
48. **Foley SL, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC. 2011.** Population Dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in comercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol* 77(13): 4273-4279.
49. **Galán JE, Curtiss III R. 1989.** Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penétrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* 86: 6383-6387.
50. **Gama NV, Berchieri Jr, Fernandes SA. 2003.** Occurrence of *Salmonella* spp. in laying hens. *Bras Cienc Avic* 5(1): 15-21. Doi: 10.1590/s1516635x2003000100002.
51. **García C. 2011.** Salmonelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana. Tesis Doctoral. España: Univ. de León. 197 p.
52. **González J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. 2014.** Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte* 30(1): 73-94.
53. **González T, Rojas RA. 2005.** Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pub Mex* 47(5): 388-390. doi: 10.1590/S0036-36342005000500010
54. **Grados O. 1974.** Presencia de *Salmonella* Enteritidis, serotipo Agona en el Perú. *Bol OPS* 77(5): 405-409.
55. **Grimont PA, Weill FX. 2007.** Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9na Ed. France: WHO. 166p.
56. **Gutiérrez AC, Paasch L, Calderón NL. 2008.** Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet Mex* 39 (1): 81-90.
57. **Hengl B, Gross BA, Vuljanic K, Crnic AM, Vazdar R, Petric J. 2016.** *Salmonella* Infantis in chicken meat on the Croatian market. *Meso* 18 (4): 342-347
58. **Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. 2002.** *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect* 129(1): 1-8. doi: 10.1017/s0950268802006842.
59. **Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S. 2009.** Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Typhimurium by a multiplex PCR – based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int J Vet Res* 3(1): 43-48. doi: 10.22059/IJVM.2009.19608

60. **Kaiser M, Lamont S.J. 2001.** Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure. Poultry Sci 80: 1105-1108. doi: 10.1093/ps/80.8.1105
61. **Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade RJ. 1995.** *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect Immun 63: 2443-2449.
62. **Kooper G, Calderon G, Schneider S, Dominguez W, Gutierrez G. 2009.** Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto económico. Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma: FAO. 192P.
63. **Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. 2018.** A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. Microb Res 206: 60-73. doi: 10.1016/j.micres.2017.09.010
64. **Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. 2015.** *Salmonella* Enteritidis in layer farms of different sizes located in northern China: on-farm sampling and detection by the PCR method. Braz J Poult Sci 19(3): 377-396. doi: 10.1590/1806-9061-2016-0318
65. **Lévano GC, López C. 2001.** Evaluación de la presencia de *Salmonella* spp. en huevos frescos, utilizando el medio xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4). Ciencia e investigación 4(1): 50-56
66. **Lublin A, Maler I, Mechani S, Pinto R, Sela-Saldinger S. 2015.** Survival of *Salmonella enterica* serovar Infantis on and within stored table eggs. J Food Protec 78(2): 287-292. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-066
67. **Luigi T, Rojas L, Valbuena O. 2015.** Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen *invA*. Salus 19(3): 41-46.
68. **Malorny B, Hoofar J, Bunge C, Helmuth R. 2003.** Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl Environ Microbiol 69(1): 290-296. doi: 10.1128/AEM.69.1.290-296.2003.
69. **Martínez N. 2007.** Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis de Doctor en Microbiología. Oviedo: Universidad de Oviedo. 156p.
70. **Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas DRC. 2011.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. Rev Panam Salud Pública 30(6): 555-560. doi: 10.1590/s1020-49892011001200010.
71. **Menon PK, Kapila K, Ohri VC. 1999.** Polymerase chain reaction and advances in infectious disease diagnosis. MJAFI 55(3): 229-231.
72. **Miyamoto T, Baba E, Tanaka T, Sasai K, Fukata T y Arakawa A. 1997.** *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. Avian Dis. 41: 296-303.
73. **Mogollón DC, Rodríguez VE, Verjan N. 2015.** Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp., contamination of eggs marketed at Ibagué, Colombia. Rev Col Ciencia Animal 8 (1): 20-28.
74. **Muriel ME. 2008.** Estimación de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Colombia en la década 1996-2006. Tesis de Microbiólogo Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 148p.
75. **Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. 2006.** The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of

naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food Microbiology 23: 599-604. doi: :10.1016/j.fm.2005.09.002.

76. **Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H. 2010.** Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol 139(suppl 1): 3-15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021
77. **Nógrády NI, Kardos G, Bisttyák A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, Juhász A, Samu P, Kaszanyitzky JE, Pásztí J, Kiss I. 2008.** Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. International Journal of Food Microbiology (127): 162-167. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.005
78. **Nucera DM, Maddox CW, Hoiem-Dalen P, Weigel RM. 2006.** Comparison of API 20E and *invA* PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. J Clin Microb 44(9): 3388-3390. doi: 10.1128/JCM.00972-06
79. **Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K y Baba E. 2001.** Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian Dis 45: 61-69.
80. **Pachón DA. 2009.** Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio – Meta. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 115p
81. **Parra M, Durango J, Mattar S. 2002.** Microbiología, patogénesis, epidemiología, y clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Rev MVZ Córdoba 7(2): 187-200. doi: 10.21897/rmvz.521
82. **Pate M, Micunovic J, Golob M, Vestby LK, Ocepek M. 2019.** *Salmonella* Infantis in broiler flocks in Slovenia: The prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. Bio Med Research International: 1-13. doi: 10.1155/2019/4981463
83. **Pedraza JG, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. 2014.** Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte 30(1): 73-94.
84. **Quino W, Hurtado CV, Escalante O, Flores D, Mestanza O, Vences F, Zamudio ML, Gavilán RG. 2019.** Multidrogoresistencia de *Salmonella* Infantis en Perú: un estudio mediante secuenciamiento de nueva generación. Rev Perú Med Exp Salud Publica 36(1): 37-45. doi: 10.17843/rpmesp.2019.361.3934.
85. **Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tukel C, Akcelik M, Baumler AJ. 2006.** Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. Infect Immun 74(1): 19-27. doi: 10.1128/IAI.74.1.19–27.2006
86. **Revolledo L, Piantino AJ. 2009.** Patología aviária. 1ª ed. Brasil: Manole. 510p.
87. **Rahn k, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. 1992.** Amplification o fan *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molec Cel Probes 6: 271-279.

88. **Ricke SC, Gast RK. 2017.** Producing safe eggs: Microbial ecology of *Salmonella*. 1^a ed. London: Elsevier. 460p.
89. **Rincón DP, Ramírez RY, Vargas JC. 2011.** Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. Rev Salud UIS 43 (2): 167-177.
90. **Roch-e-Silva RC, Cardoso WM, Aragao A, Siqueira de Castro R, Holanda A, Vasconcelos R. 2016.** Evaluation of *Salmonella Pullorum* shedding in japanese quails. Cienc anim bras 17(4): 550-556. doi: 10.1590/1089-6891v17i425039.
91. **Romero CR. 2007.** Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3^a ed. México D.F.: Médica Panamericana. 787 p.
92. **Sachse K. 2003.** Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. Mol Biotechnol 26(1): 61-80. doi: 10.1385/MB:26:1:61
93. **Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. 2013.** Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 1^a ed. México: Ed. McGraw. 324p.
94. **Samiullah, Chousalkar kk, Roberts JR, Sexton M, May D, Kiermeier A. 2013.** Effects of egg Shell quality and washing on *Salmonella* Infantis penetration. Int Jou Food Microb 12(3): 185-191. doi: 10.3923/ijps.2013.185.191
95. **Sánchez LC, Corrales LC. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova 3(4): 21-29. doi: 10.22490/24629448.333
96. **[JAEC] Japan International Agricultural Council. 2000.** Color manual Diseases of Bird. Tokyo: JRA. 217p.
97. **Schmidt H, Hensel M. 2004.** Pathogenicity Island in Bacterial Pathogenesis. Clin Microbiol Rev 17(1): 14-56. doi: 10.1128/CMR.17.1.14-56.2004.
98. **Silva G, López HS. 2012.** Genes involved pathogenesis, persistence, excretion of *Salmonella* in animal models. Rev Colomb Cienc Pecu 2(1225): 107-122
99. **Soria MA. 2011.** Presencia de *Salmonella* y características físicas de huevos destinados a consumo humano. Tesis de Master en Ciencias Veterinarias. Esperanza: Universidad Nacional del Litoral. 195p.
100. **Soto Z, Pérez L, Estrada D. 2016.** Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Salud Uninorte 32(1): 105-122. doi: 10.14482/sun.32.1.8598
101. **Stanchi NO, Martino PE, Gentilini E, Reinoso EH, Echevarría MG, Leardini NA, Copes JA. 2007.** Microbiología Veterinaria. 1^a ed. Buenos Aires: Inter-Médica. 572p.
102. **Suárez MC, Mantilla JR. 2000.** Presencia de *Salmonella* serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. IATREIA 13(4): 237-245.
103. **Talavera M, Reyes NE, Lagunas S, Fernandez P, Morales V, Soriano E. 2011.** Variabilidad genética de aislamiento de *Salmonella* Typhimurium (grupo B) obtenidos de hígados de pollo destinados para consumo humano. Rev Mex Cienc 2(4): 371-380.
104. **Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013.** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Inv Disc 2(2): 70-78.
105. **Terzolo HR. 2009.** Tifosis y Paratifosis de las aves en Latinoamérica y en el mundo. En: XXI Congreso Latinoamericano de Avicultura. La Habana: Asociación Latinoamericana de Avicultura.

106. **Torrubia FJ, Gómez C, Van den Berg T, Téllez S, Hauck R. 2014.** Vacunación en avicultura. Zaragoza: Servet. 208p.
107. **Turki Y, Mehri I, Ouzari H, Khessairi A, Hassen A. 2014.** Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes. J Gen Appl Microbiol 60: 123-130. doi: 10.2323/jgam.60.123
108. **Uribe C, Suárez MC. 2006.** Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colomb Med 37 (2): 151-158.
109. **Valderrama M, Quevedo M, Pastor J, Mantilla Y, Ortiz M. 2014.** Estudio de prevalencia de serovares de *Salmonella* en las granjas avícolas tecnificadas en el Perú. Lima: SENASA. 31p
110. **Vallejos K, Tataje L, Villanueva D, Bendejú J, Montalván A, Zimic M, Fernández M. 2019.** Whole-genome sequencing of a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strain isolated from broiler chicken in Perú. Microbiol Resour Announc 8(43):1-4. doi: 10.1128/MRA.00826-19.
111. **Zambrano H, Lucas J, Vilca M, Ramos D. 2013.** Determinación de *Salmonella* spp en centros de beneficio clandestino de pollos de engorde de Lima, Perú. Rev Inv Vet Perú 24(3): 337-345.
112. **Zamudio ML, Arias I, Luna MA, Valenzuela A, Segovia E, Villanueva E. 2008.** Vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos en el Perú. Bol Inst Nac Salud (14): 103-104.
113. **Zamudio ML, Meza A, Bailón H, Martínez J, Campos J. 2011.** Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. Rev Per Med Exp Sal Publ 28(1): 128-135.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Purificación de DNA genómico de Bacterias Gram negativas

1. Recolectar 2×10^9 células bacterianas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 - 2 ml por centrifugación por 10 minutos a 5000 X g. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 μ L de Solución de Digestión. Añadir 20 μ L de Proteinasa K y mezclar bien utilizando el Vortex o pipeteando hasta obtener una suspensión uniforme.
3. Incubar la muestra a 56° C mientras ocasionalmente se coloca en el Vortex o usar un Baño María, una plataforma oscilante o termomezclador hasta que las células se encuentren totalmente lisadas (~30 min).
4. Añadir 20 μ L de Solución de RNasa A, mezclar utilizando el Vortex e incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 μ L de Solución de Lisis a la muestra. Mezclar bien utilizando el Vortex por alrededor de 15 segundos hasta que se obtenga una mezcla homogénea.
6. Añadir 400 μ L de etanol al 50% y mezclar pipeteando o usando el Vortex.
7. Transferir el lisado a una Columna del kit insertada en un tubo colector. Centrifugar la columna por 1 minuto a 6000 X g. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado. Coloque la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
8. Añadir 500 μ L de Wash Buffer I (con etanol añadido). Centrifugar por 1 minuto a 8000 X g. Descartar el filtrado y colocar la columna de purificación de regreso en el tubo colector.
9. Añadir 500 μ L de Wash Buffer II (con etanol añadido) a la columna. Centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima (≥ 1200 X g). Descarte el tubo colector que contiene el filtrado y transferir la columna a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL (no incluido).

Opcional: Si se observa una solución residual en la columna de purificación, vacíe el tubo colector y centrifugue nuevamente por 1 minuto a máxima velocidad.

10. Añadir 100 μ L de Buffer de Elución al centro de la membrana de la columna para eluir el DNA genómico. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8000 X g.

Nota:

- Para un máximo rendimiento de DNA, repetir la elución con 100 μ L de Buffer de Elución adicionales.

- Si se requiere una mayor concentración de DNA o si el DNA es aislado de una pequeña cantidad de material inicial, el volumen del Buffer de Elución añadido a la columna puede ser reducido a 50-100 µL. Por favor, ser consciente de que pequeños volúmenes de Buffer de Elución resultará en pequeñas cantidades finales de DNA eluído.

11. Descartar la columna de purificación. Usar el DNA purificado inmediatamente o almacenar a - 20° C

Anexo 2

Lista de cepas en estudio.

Nº	CÓDIGO	FUENTE	ESPECIE ANIMAL	FECHA DE AISLAMIENTO	DISTRITO DE PROCEDENCIA	SEROTIPO
1	E6	Folículo ovárico	Gallina ponedora	09/09/2012	Lima	Infantis
2	E47	Huevos comerciales	Gallina ponedora	22/05/2015	Lima	Infantis
3	E57	Huevos comerciales	Gallina ponedora	03/09/2016	San Juan de Miraflores	Infantis
4	E58	Huevos comerciales	Gallina ponedora	03/09/2016	San Juan de Miraflores	Infantis
5	E68	Huevos comerciales	Gallina ponedora	03/09/2016	San Juan de Miraflores	Infantis
6	E71	Huevos comerciales	Gallina ponedora	03/09/2016	San Juan de Miraflores	Infantis
7	E72	Huevos comerciales	Gallina ponedora	03/09/2016	San Juan de Miraflores	Infantis
8	E70	Huevos comerciales	Gallina ponedora	24/09/2016	Lurín	Infantis
9	E73	Huevos comerciales	Gallina ponedora	24/09/2016	Lurín	Infantis
10	A01	Huevos comerciales	Gallina ponedora	15/04/2017	Lima	Infantis
11	A02	Huevos comerciales	Gallina ponedora	15/04/2017	Lima	Infantis
12	A10	Hígado	Codorniz	21/05/2017	Lurín	Infantis
13	A7	Huevos comerciales	Gallina ponedora	17/08/2017	Lima	Infantis
14	A23	Carcasa	Pollo	10/09/2017	Lima	Infantis
15	A24	Carcasa	Pollo	11/09/2017	Lima	Infantis
16	A25	Carcasa	Pollo	12/09/2017	Lima	Infantis
17	20DY	Huevos comerciales	Gallina ponedora	17/10/2017	Santa Anita	Enteritidis
18	E65	Huevos comerciales	Gallina ponedora	17/10/2017	Santa Anita	Enteritidis
19	E66	Huevos comerciales	Gallina ponedora	17/10/2017	Santa Anita	Enteritidis

20	E69	Huevos comerciales	Gallina ponedora	17/10/2017	Santa Anita	Enteritidis
21	E5	Huevos comerciales	Gallina ponedora	09/09/2012	Lima	Typhimurium
22	E42	Bazo	Pato	15/04/2015	Lima	Typhimurium
23	50Ac	Huevos comerciales	Gallina ponedora	06/10/2017	Villa El Salvador	Typhimurium
24	A03	Bazo	Codorniz	20/04/17	Lurín	Gallinarum
25	A04	Bazo	Codorniz	20/04/17	Lurín	Gallinarum
26	A05	Hígado	Codorniz	05/05/2017	Lurín	Gallinarum
27	A06	Bazo	Codorniz	06/05/2017	Lurín	Gallinarum
28	E75	Huevos comerciales	Gallina ponedora	12/05/2017	San Juan de Miraflores	Gallinarum
29	E76	Huevos comerciales	Gallina ponedora	12/05/2017	San Juan de Miraflores	Gallinarum
30	E77	Huevos comerciales	Gallina ponedora	12/05/2017	Santa Anita	Gallinarum
31	E30	Huevos comerciales	Gallina ponedora	10/02/2015	Lima	Pullorum
32	E31	Huevos comerciales	Gallina ponedora	10/02/2015	Lima	Pullorum
33	E54	Hígado	Codorniz	14/09/2015	Lima	Pullorum
34	A12	Bazo	Codorniz	13/06/2017	Lurín	Pullorum
35	A8	Folículo ovárico	Codorniz	10/07/2017	Lurín	Pullorum
36	A9	Bazo	Codorniz	10/07/2017	Lurín	Pullorum
37	A17	Hígado	Codorniz	10/07/2017	Lurín	Pullorum
38	A18	Folículo ovárico	Codorniz	20/07/2017	Lurín	Pullorum
39	A19	Bazo	Codorniz	20/07/2017	Lurín	Pullorum
40	A20	Hígado	Codorniz	20/07/2017	Lurín	Pullorum
41	A13	Folículo ovárico	Codorniz	22/07/2017	Lurín	Pullorum
42	A14	Bazo	Codorniz	22/07/2017	Lurín	Pullorum
43	A15	Hígado	Codorniz	22/07/2017	Lurín	Pullorum
44	A16	Hígado	Codorniz	22/07/2017	Lurín	Pullorum
45	A21	Folículo ovárico	Codorniz	25/07/2017	Lurín	Pullorum
46	A22	Bazo	Codorniz	25/07/2017	Lurín	Pullorum